UNIVERSITÉ DE LAUSANNE – FACULTÉ DES SCIENCES

# Histochimie de la peau de la souris badigeonnée par diverses substances cancérigènes ou non. Recherche de critères histochimiques précoces de cancérisation

THÈSE DE DOCTORAT

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Lausanne

par

CHRISTIANE YERLY

licenciée ès sciences

1976

Juris Druck + Verlag Zurich

1977

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546820_0027

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE – FACULTÉ DES SCIENCES

# Histochimie de la peau de la souris badigeonnée par diverses substances cancérigènes ou non. Recherche de critères histochimiques précoces de cancérisation

THÈSE DE DOCTORAT

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Lausanne

par

CHRISTIANE YERLY

licenciée ès sciences

Juris Druck + Verlag Zurich

1977

IMPRIMATUR

Université de Lausanne

Faculté des Sciences

Vu le rapport présenté par le jury d'examen, composé de MM Dr. S. Neukomm, directeur de thèse, Prof. P.E. Pilet, rapporteur de la Faculté, et Prof. A. Delessert, président du jury, le Conseil de Faculté autorise l'impression de la thèse de Mlle Christiane Yerly, licenciée ès sciences naturelles (diplôme d'Etat) de l'Université de Lausanne, intitulée:

«Histochimie de la peau de la souris badigeonnée par diverses substances cancérigènes ou non. Recherche de critères histochimiques précoces de cancérisation».

Lausanne, le 15 décembre 1976 Pour le doyen de la Faculté des Sciences:

André Delessert, vice-doyen

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mes parents

Je remercie sincèrement Monsieur le Docteur S. Neukomm, privat-docent, qui en tant que médecin-chef du Département de recherches expérimentales de l'Institut universitaire de médecine sociale et préventive a bien voulu m'accueillir dans ses laboratoires, inspirer et diriger la présente thèse. Par ses conseils judicieux et l'intérêt qu'il a porté au travail expérimental, il a guidé cette recherche et m'a stimulée tout particulièrement lors de la collecte fastidieuse des mesures microdensitométriques. Malgré le changement d'orientation de sa carrière, il m'a permis et a insisté auprès des autorités pour que je puisse terminer cette thèse. Sa disponibilité et la gentillesse avec laquelle il m'a toujours reçue m'ont été d'un grand secours pendant la période de la rédaction qui fut troublée par la réorganisation complète de l'Institut.

Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance .

Je remercie également Monsieur le Professeur P.E. Pilet, directeur de l'Institut de Biologie et de Physiologie Végétale, qui a su par son enseignement remarquable et son esprit méthodique me donner goût à la recherche, et qui a bien voulu suivre l'évolution de mes travaux et rapporter sur leur valeur et leur signification .

Je remercie encore tout le personnel de l'Institut qui a participé à la réalisation de mes travaux, tout particulièrement M. P. Madelaine qui organisa, surveilla notre animalerie et en contrôla la santé avec beaucoup de compétence et qui, de plus, dactylographia cette thèse. Mes sincères remerciements vont également à M. C. Durussel qui comme apprenti me seconda avec adresse lors des manipulations, des autopsies et de l'histologie des quelques 500 animaux impliqués dans cette étude .

# TABLE DES MATIERES


| | page |
|---|---|
| AVANT - PROPOS | |
| 1. Généralités | 1 |
| 2. La carcinogénèse chimique | 2 |
| 2.1. Phénomène biologique | 2 |
| 2.2. Phénomène chimique | 4 |
| 3. Les tests de cancérisation | 6 |
| 4. L'histochimie quantitative | 8 |
| 5. Le problème | 8 |
| CHAPITRE I. MÉTHODOLOGIE | 10 |
| 1. Introduction | 10 |
| 2. Expérimentation animale | 10 |
| 2.1. Choix et répartition des animaux | 10 |
| 2.1.1. exigences de la statistique | 16 |
| 2.1.2. formation des lots | 17 |
| 2.1.3. condition de vie au sein de l'animalerie | 17 |
| 2.2. Choix des traitements | 18 |
| 2.2.1. méthodes de badigeonnage | 19 |
| 2.2.2. phénomène de cancérisation | 20 |
| 2.2.3. phénomène de cocancérisation | 25 |
| 2.2.4. choix des témoins | 26 |
| 2.2.5. résumé des traitements effectués | 27 |
| 3. Méthodes histochimiques | 30 |
| 3.1. Introduction | 30 |
| 3.2. Microdensitomètre | 31 |
| 3.2.1. description de l'appareil | 31 |
| 3.2.2. linéarité et reproductibilité | 33 |
| 3.2.3. étalonnage du monochromateur | 37 |

page

3.3. Technique de Feulgen pour le dosage du DNA 39
3.3.1. introduction 39
3.3.2. choix du fixateur 40
3.3.3. étude de l'optimum d'hydrolyse 40
3.3.4. technique utilisée 45

3.4. Méthode pour le dosage des histones 46
3.4.1. introduction 46
3.4.2. choix d'une méthode 47
3.4.3. étude stoechiométrique 47
3.4.4. méthode utilisée pour la coloration et le dosage des histones 53

3.5. Estimation de l'activité des phosphomonoestérases non spécifiques 55
3.5.1. introduction 55
3.5.2. étude de la cinétique enzymatique 56
3.5.3. technique pour la phosphatase acide 60
3.5.4. technique pour la phosphatase alcaline 62

CHAPITRE II. OBSERVATIONS MACRO- ET MICROSCOPIQUES AU COURS DES DIVERS TRAITEMENTS. 68

1. Effets macroscopiques 68
1.1. Santé générale 68
1.2. Effets des divers traitements sur la peau 68

2. Effets microscopiques 73
2.1. Diagnostics histologiques de la peau 73
2.2. Epaisseur de l'épiderme 78
2.3. Estimation de l'index mitotique de l'épiderme 78

3. Discussion 80
3.1. Effet de l'acétone 80
3.2. Effet du benzo(a)pyrène 81
3.3. Rôle de l'huile de croton et de la benzacridine 81

page

CHAPITRE III. ETUDE QUANTITATIVE DU DNA ET DES HISTONES ÉPIDERMIQUES DE LA SOURIS 83

1. Animaux non traités 83

1.1. Ploïdie des noyaux épidermiques interphasiques 88

1.2. Variations d'un individu à l'autre 97

1.3. Variations sexuelles 97

1.4. Variations raciales 97

2. Effet du traitement à l'acétone 97

3. Effet de la cancérisation 97

3.1. Variations dues à un cancérigène fort 97

3.2. Variations dues à un cancérigène faible 98

4. Phénomène de cocancérisation 98

4.1. Effet d'un cocancérigène seul (huile de croton) 98

4.2. Effets combinés d'un cancérigène et d'un cocancérigène (carcinogénèse en deux phases) 99

5. Discussion et conclusion 99

5.1. Le DNA. 99

5.2. Les histones 105

CHAPITRE IV. ETUDE DE L'ACTIVITÉ PHOSPHOMONOESTÉRASIQUE NON SPÉCIFIQUE AU NIVEAU DE LA PEAU DE LA SOURIS TRAITÉE OU NON . 109

1. Localisation des enzymes et activité normale chez la souris 109

1.1. Localisation 109

1.1.1. phosphatase acide 109

1.1.2. phosphatase alcaline 110

1.1.3. artefacts de colorations 110

1.2. Activité normale chez la souris 110

1.2.1. variations individuelles 110

1.2.2. variations sexuelles 117

1.2.3. variations raciales 117

page

2. Conséquence du traitement à l'acétone 117

3. Modifications de l'activité phosphatasique en fonction de la cancérisation 117

3.1. Action du benzo(a)pyrène 117

3.2. Action de la benzacridine 118

4. Phénomène de cocancérisation 118

4.1. Influence d'un cocancérigène seul (huile de croton) 118

4.2. Effets combinés d'un cancérigène et d'un cocancérigène 123

5. Discussion et conclusions 123

DISCUSSION GÉNÉRALE 128

1. Critère histochimique précoce de cancérisation 128

2. Relation histochimique entre la néoplasie épidermique du triton et celle de la souris 130

CONCLUSIONS 132

RÉFÉRENCES 134

## AVANT - PROPOS

### 1. GENERALITES

Malgré les progrès remarquables de la biologie moléculaire (124), malgré la découverte de la microscopie électronique, des marqueurs radioactifs, ou des phénomènes immunologiques et leur utilisation intensive dans la recherche du cancer, les mécanismes exacts de la transformation maligne de la cellule ne sont pas encore élucidés. Si des facteurs endogènes tels que les hormones peuvent influencer l'apparition et le développement de certaines tumeurs ( 8 ), c'est avant tout l'induction du cancer par des facteurs exogènes, tels que les virus, les radiations ionisantes ou les carcinogènes chimiques qui est l'objet du plus grand nombre de recherches. Ces éléments semblent en effet jouer un rôle toujours plus grand dans l'étiologie des tumeurs humaines.

Depuis le début du siècle, nous savons que les ouvriers manipulant le goudron, certaines amines aromatiques, ou des dérivés du chrome présentent une incidence accrue des carcinomes de la peau, de la vessie ou du poumon. Les études nombreuses effectuées sur la fumée du tabac et l'environnement ont établi avec certitude la relation existant entre ces éléments et les cancers du tractus respiratoire et de l'oesophage ( 17 ) ( 44 ) ( 46 ) ( 56 ) (129 ) (130 ).

L'origine virale de certains cancers chez l'animal n'est plus à démontrer. Cependant, dans un grand nombre de tumeurs il est, pour l'instant, impossible de mettre en évidence quelque virus que se soit. Ceci nous amène à penser que le virus, comme le cancérigène chimique, agit sur un facteur cellulaire qui déclanche la transformation cancéreuse ( 93 ).

Les radiations ionisantes sont également responsables de la formation de cancers. Leur caractère mutagène bien connu, a permis d'associer le phénomène de cancérisation à un phénomène de mutation de la cellule somatique. Cette théorie, très généralement acceptée, permet de comprendre que des éléments aussi différents qu'un composé chimique, un virus ou un rayonnement aient les mêmes conséquences physiopathologiques sur une cellule, soit la transformation d'un ou plusieurs gènes spécifiques au niveau du chromosome entraînant la division incontrôlée de la cellule et bloquant (ou débloquant) sa différenciation (42 )(122).

## 2. LA CARCINOGENESE CHIMIQUE

Les carcinogènes chimiques ont joué et continueront de jouer un rôle important dans la recherche fondamentale, en raison même de leur grand nombre et de leur variété, ce qui permet au chercheur d'étudier simultanément ou successivement de nombreux modèles expérimentaux de cancérisation. D'autre part, la plupart des tumeurs obtenues avec ces substances offrent une grande ressemblance avec les cancers humains. Il faut admettre, après 50 ans de recherches continues, que les carcinogènes chimiques ont apporté à la recherche sur le cancer une contribution pratique et théorique plus significative que toute autre approche expérimentale.

### 2.1. Phénomène biologique

En l'état actuel de nos connaissances sur le phénomène de la cancérisation, cinq conclusions générales et importantes permettent de le situer et de le définir au plan biologique(101):

1. Les effets des cancérigènes sont dépendant de la dose, ils sont additifs et irréversibles ( 14 )(94).

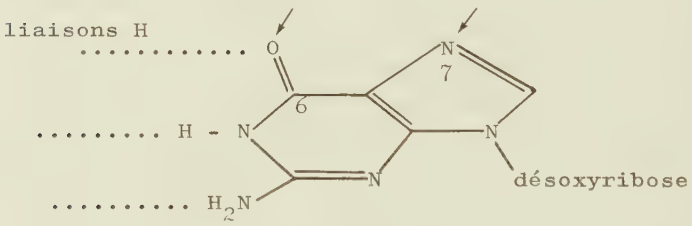
2. La cancérisation n'est pas un phénomène instantané: une période de latence minimum est toujours nécessaire pour que le processus malin soit déclanché ( 14 ).
3. Les transformations cellulaires induites par les cancérigènes sont transmises aux cellules filles lors de la division cellulaire ( 73 ).
4. La carcinogénèse se fait en deux phases distinctes, une phase d'initiation suivie d'une phase de promotion ( 7 ).
5. Le phénomène de cancérisation est étroitement lié à la prolifération cellulaire, cette prolifération étant l'essence même de la promotion. La découverte de ce principe a permis de comprendre qu'un agent activant la division cellulaire, active également l'apparition du cancer pour autant que ce dernier soit initié.

Il en découle que les agents initiateurs ont des effets discrets sur la cellule, dépendant de la dose reçue qui sont transmissibles aux cellules filles dans les heures qui suivent le traitement ( 73 ). Cependant, même dans les conditions optimales de prolifération, ces effets ne conduisent jamais à un cancer instantané. La vraie malignité, aussi bien in vivo qu'in vitro ne se développe qu'après un nombre de divisions cellulaires appréciable . Dès que l'initiation est faite, la prolifération est donc un phénomène important qui entraîne la révélation de la cancérisation, et c'est le rôle des agents promoteurs. Si toutes les théories et tous les mécanismes connus de la cancérisation sont en accord avec ces faits de base, le problème de l'irréversibilité et par conséquent de l'additivité des effets des cancérigènes chimiques reste encore très controversé ( 81 ): Alors que Mondal et Heidelberger ( 73 ) démontrent que l'absence de division cellulaire n'abolit pas l'état initié, puisqu'ils réussissent à mettre en évidence cette potentialité des mois et même des années plus tard, Wynder et coll (128) démontrent également que des cancérigènes chimiques tels que le benzo(a)pyrène ou le méthylcholanthrène ne produisent pas d'effet progressif , mais suivent en réalité une loi de "tout ou rien".

2.2. Phénomène chimique

Le mode d'action des initiateurs au niveau moléculaire a été l'objet de nombreuses investigations. Les agents alkylants dont le pouvoir cancérigène et mutagène est bien connu ont permis de montrer que la guanine du DNA était tout particulièrement apte à réagir avec ces substances au niveau de son N(7)( 12 ). Une telle liaison peut avoir de fâcheuses conséquences : les guanines alkylées seraient modifiées de telle façon qu'elles s'apparieraient avec la thymine au lieu de la cytosine. Des travaux récents sur les nitrosamines et les nitrosamides suggèrent que l'alkylation du O(6) de la guanine est plus carcinogénique encore ( 68 )(Figure 1).

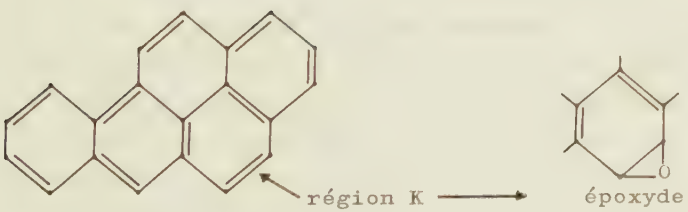
Figure 1 : sites d'alkylation de la guanine ( → )




Les hydrocarbures polycycliques forment beaucoup moins facilement des liaisons covalentes avec les constituants tissulaires. Brookes et Lawley ( 13 ) appliquèrent divers hydrocarbures polycycliques marqués à la peau de la souris. Le DNA isolé de l'épiderme 12 heures et 24 heures après le traitement contenait une quantité

mesurable de radioactivité qui résistait à un processus de purification poussé. Ils constatèrent que la liaison des hydrocarbures au DNA s'accroissait avec leur pouvoir cancérigène, cette relation étant variable pour la radioactivité liée au DNA, mais pas pour celle liée au RNA et aux protéines. La nature exacte de cette liaison chimique n'est pas connue, mais on sait cependant que les hydrocarbures polycycliques aromatiques subissent une activation métabolique ( 32 ). Grower et Sims ( 45 ) en 1970 suggèrent que la région anthracénoïde ou région K des hydrocarbures polycycliques est oxydée in vivo par des enzymes microsomiales pour former un époxyde (Figure 2.). Ils ont démontré que de tels époxydes ont la réactivité des agents alkylants et se lient plus facilement que les carcinogènes non oxydés au DNA in vitro. Ils peuvent donc également interférer avec des fonctions du DNA et causer des mutations ponctuelles ou d'autres altérations permanentes de sa molécule.

Figure 2 : Région anthracénoïde ou région K du benzo(a)pyrène




benzo(a)pyrène

## 3. LES TESTS DE CANCERISATION

L'accroissement de l'industrialisation dans le monde a eu pour conséquence de mettre l'homme en contact avec une variété de plus en plus considérable de produits de déchets, dont la toxicité est très souvent mal connue, sinon totalement ignorée. Parmi eux se trouvent de nombreux agents cancérigènes et certainement aussi de nombreux produits co-cancérigènes. Il est de la plus haute importance de posséder des méthodes biologiques permettant de détecter de façon aussi simple et rapide que possible l'éventuel pouvoir cancérigène et co-cancérigène de tous ces produits qui polluent chaque jour davantage notre environnement.

L'étude du pouvoir cancérigène des agents chimiques a donc nécessité la mise au point de tests biologiques. Les animaux utilisés le plus fréquemment sont la souris, le rat, et le chien. Kennaway ( 54 ) fut l'un des premiers à introduire un test de badigeonnage de la peau de la souris pour mettre en évidence le pouvoir cancérigène du goudron. Depuis, de nombreux autres tests ont été mis au point, utilisant toutes les voies d'administration, pour pouvoir atteindre dans les meilleures conditions l'organe le plus sensible au cancérigène éventuel.

Nous nous limiterons ici volontairement à rappeler les seuls tests que nous utilisons nous-mêmes dans le cadre de nos études sur les polluants atmosphériques: cancérisation de souris nouvelles-nées selon Della Porta ( 27 ),injections sous-cutanées chez la souris avec véhicule spécial - le talc-huile - selon Neukomm ( 80 ) et enfin un test de badigeonnage de la peau de la souris selon Wynder et coll. (128).

Tous ces tests présentent le désavantage d'être longs et fastidieux; ils portent presque toujours sur toute la vie de l'animal; ils nécessitent de grandes quantités de produits et des traitements répétés. C'est pourquoi nous avons essayé de trouver des méthodes plus sensibles et plus rapides; nous y sommes parvenus en reprenant le test de Happert sur le poumon de la souris qui s'effectue en 10 mois seulement et qui n'exige que des doses très faibles de benzo(a)pyrène (131). Mais indépendemment de ces tests sur la souris nous avons continué d'employer le test triton mis au point en 1957 par Neukomm ( 78). Il s'agit d'un test ultra-rapide et sensible provoqué sur le triton crêté qui a déjà permis d'identifier de nombreux cancérigènes dont par exemple ceux de la fumée du tabac ( 79). A ce sujet une étude histophotométrique et caryométrique de la néoplasie expérimentale de l'épiderme de cet animal ( 70) montra que l'administration d'une solution huileuse de méthylcholanthrène stimule la prolifération cellulaire et accroît la quantité de DNA et le volume des noyaux. Ces cellules acquièrent alors la propriété d'envahir les tissus voisins. Ces phénomènes sont comparables à ceux que l'on observe dans le foie en régénération des mammifères ou au niveau d'un épithélium pluristratifié en voie de cancérisation. C'est en vue de confirmer sur l'épiderme d'un mammifère et d'étendre les conclusions de ce dernier travail,que nous avons décidé de faire une étude histochimique systématique de la peau de la souris. Par ailleurs, introduisant en ce domaine plus de données quantitatives, nous avons voulu rechercher si l'évolution de certains indicateurs biochimiques tels que le DNA ou d'autres substances importantes du métabolisme pourraient par leur dosage à un stade très précoce de la cancérisation servir de test histochimique rapide de la cancérisation.

## 4. L'HISTOCHIMIE QUANTITATIVE

L'histochimie, dont le but est de reconnaître, par des réactions chimiques appropriées, les différents produits que la cellule forme et transforme pendant sa vie, ne fut très longtemps qu'une science qualitative et empirique. C'est à Lison ( 65 ) que l'on doit en 1936 la transformation de l'ensemble hétéroclite des recettes existantes en une discipline scientifique, sur la base de laquelle, Caspersson ( 18 ) développa la même année, des méthodes "quantitatives" (ces méthodes ne pouvant en réalité être considérées que comme semi-quantitatives compte tenu de l'amplitude des erreurs de confection et de coloration de la coupe, ainsi que lors des mesures histophotométriques( 86 )). C'est sur le principe de l'appareil qu'il mit au point et plus tard sur celui de Deeley ( 25 ) que la plupart des microdensitomètres actuels sont basés. Il s'agit en réalité d'appareils de plus en plus perfectionnés, formés d'un microscope et d'un spectrophotomètre couplés, munis d'accessoires supprimant certaines erreurs, dont le principal est un système de "scanning" de l'objet, permettant de mesurer avec plus de précision des surfaces irrégulièrement colorées.

A condition que la réaction histochimique choisie soit spécifique, sensible et reproductible, nous avons à notre disposition une technique élégante, toute indiquée pour l'étude d'un tissu aussi complexe et peu homogène que la peau.

## 5. LE PROBLEME

Notre travail a été dicté par le besoin impératif en médecine préventive de tests biologiques rapides sensibles et spécifiques, permettant d'estimer le pouvoir cancérigène global de nouvelles substances commercialisées ou des polluants atmosphériques.

La souris reste l'animal de choix pour ce genre d'études, car elle est prolifique, peu encombrante et sensible à de très nombreux cancérigènes. Elle a de plus une pathologie générale très comparable à celle de l'homme. Les tests existants jusqu'à ce jour sur cet animal sont soit longs et fastidieux, soit plus rapides mais peu spécifiques. Le "test triton" ultra-rapide et sensible préconisé par Neukomm ( 78 ) n'est pour l'instant pas toujours utilisable à ces fins, car les tumeurs obtenues ont des propriétés biologiques et biochimiques insuffisamment étudiées pour pouvoir être comparées à celles des mammifères. De plus en l'état actuel de nos connaissance sur ce sujet, ce sont essentiellement les hydrocarbures polycycliques et vraisemblablement quelques dérivés des carbamates et des nitrosamines qui provoquent une néoplasie épithéliale de la peau du triton.

Notre programme de recherche comporte, le badigeonnage de la peau de la souris par deux cancérigènes , un cocancérigène et un solvant, l'étude histochimique de ces quatre substances et l'étude de l'apparition des papillomes et des cancers cutanés (latence et fréquence). Du point de vue histochimique, les "indicateurs" choisis comme paramètres de la cancérisation sont :

1. le DNA, en vertu des nombreuses études déjà faites sur l'épiderme normal et cancéreux des rongeurs ou de l'homme et en comparaison avec l'étude faite par Marti (70 ) sur le triton.
2. les histones, en raison de leur relation avec le DNA (110).
3. les phosphatases acides et alcalines en raison de leur intérêt en chimie clinique ( 20 )(84).

D'autres substances fondammentales de la peau telles que les mucopolysaccharides ou les lipides n'ont pu être étudiées faute de temps et de moyens, mais pourront peut-être faire l'objet d'un prochain travail si l'on nous en donne les possibilités matérielles.

# CHAPITRE I - MATÉRIEL ET MÉTHODE

## 1. INTRODUCTION

Dans une première étape, nous avons mis sur pied une expérimentation de cancérisation de la peau de la souris. Cette expérience a été planifiée avec soin en raison de sa dimension, et compte tenu qu'elle ne pouvait être répétée sans une perte considérable de temps.

Dans une deuxième étape, nous avons étudié les méthodes histochimiques permettant de suivre l'évolution des quatre substances choisies en fonction de l'apparition du cancer de la peau. Le choix de ces méthodes a été dicté par les critères suivants :

- La réaction histochimique doit donner une coloration spécifique dans le spectre visible, qui puisse être analysée par le microdensitomètre que nous possédons.
- Elle doit suivre les lois de Lambert-Beer.
- Elle doit colorer électivement la substance à doser sans donner de coloration annexe (coloration de fond par l'un ou l'autre des produits utilisés et/ou formés dans la réaction spécifique par exemple)(107).

## 2. EXPERIMENTATION ANIMALE

### 2. 1. Choix et répartition des animaux

Des souris albinos des deux souches SwE/Nm et R3/Nm dont l'arbre généalogique est connu (fig. 1.1. et fig. 1.2.), constituent le matériel animal de notre expérience. La pureté de ces souches a été maintenue dans notre laboratoire grâce à un contrôle rigoureux de la

reproduction frères-soeurs tel qu'il a été encore récemment rappelé par Sabourdy (102). Elle a été vérifiée après la 20$^{e}$ génération, par un test d'histocompatibilité (greffes de peau) dont les résultats sont reportés dans le tableau I.1. et la figure I.3..

Tableau I.1. : Contrôle de la pureté des souches SwE/Nm et R3/Nm par histocompatibilité.

| TYPE DE GREFFES | DONNEURS | RECEVEURS | % DE REPRISE |
|---|---|---|---|
| AUTOGREFFES | SwE ♂ | donneur | 75 |
| prélevées sur | SwE ♀ | donneur | 77,7 |
| la queue | R 3 ♂ | donneur | 100 |
| donneur = receveur | R 3 ♀ | donneur | 100 |
| ISOGREFFES | SwE ♂ | SwE ♂ | 75 |
| prélevées sur | SwE ♀ | SwE ♀ | 88,8 |
| le dos rasé | R 3 ♂ | R 3 ♂ | 88,8 |
| donneur ≠ receveur | R 3 ♀ | R 3 ♀ | 80 |
| | SwE ♂ | R 3 ♂ | 0 |
| | SwE ♀ | R 3 ♀ | 0 |
| | R 3 ♂ | SwE ♂ | 0 |
| | R 3 ♀ | SwE ♀ | 0 |

Nous avons de plus établi les fréquences des tumeurs malignes spontanées de ces deux souches sur des lots d'animaux nés dans le courant des années 1972 et 1973. Les résultats donnés dans le tableau I.2. montrent que les épithéliomas spontanés de la peau sont peu fréquents .

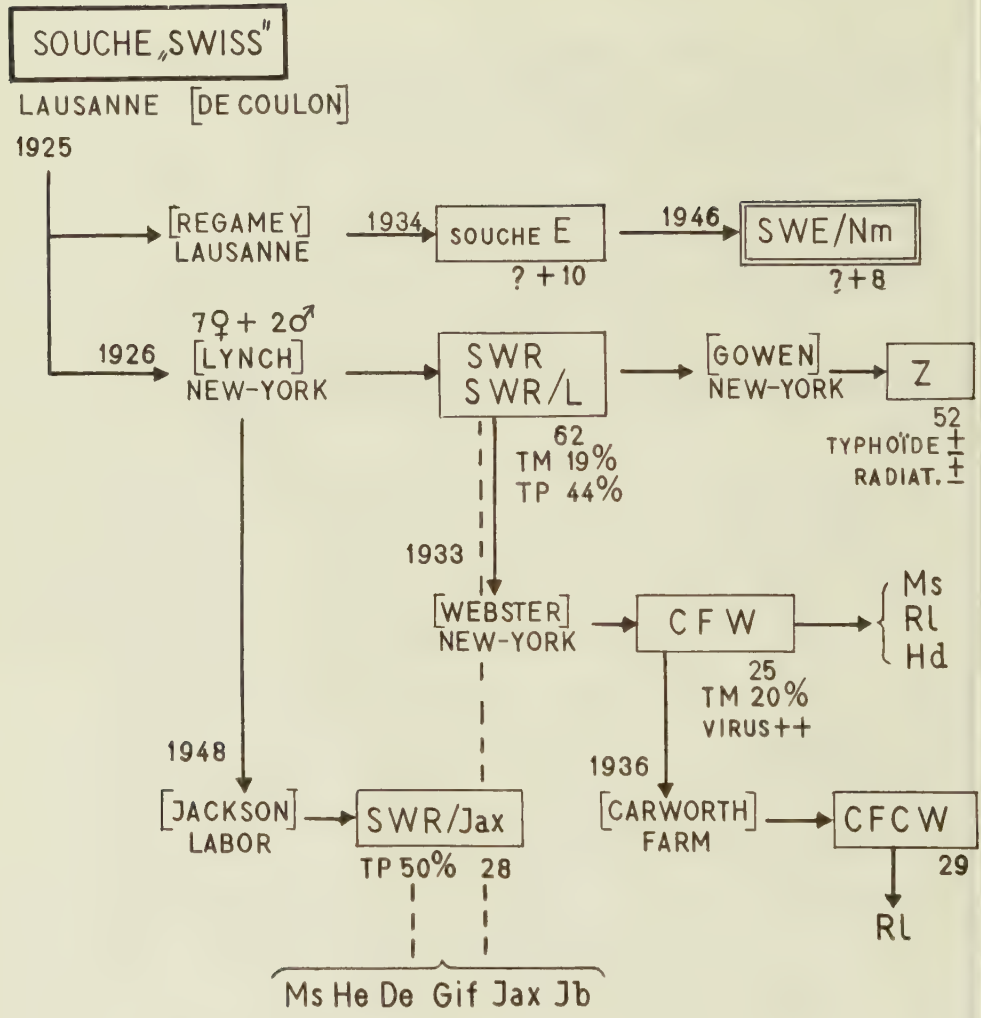



Figure I. 1.:
Arbre généalogique de notre souche Swiss E/Nm établi d'après Staats (114) par Neukomm en 1964. Les chiffres donnés à la droite des encadrements correspondent au nombre de générations "frère-soeur". Les abréviations sous accolade sont les initiales soit de l'auteur, soit du lieu où la souche est entretenue. T.M.= Tumeurs mammaires. T.P.= Tumeurs pulmonaires. La souche SwE/Nm en est actuellement à sa 31$^{e}$ génération.

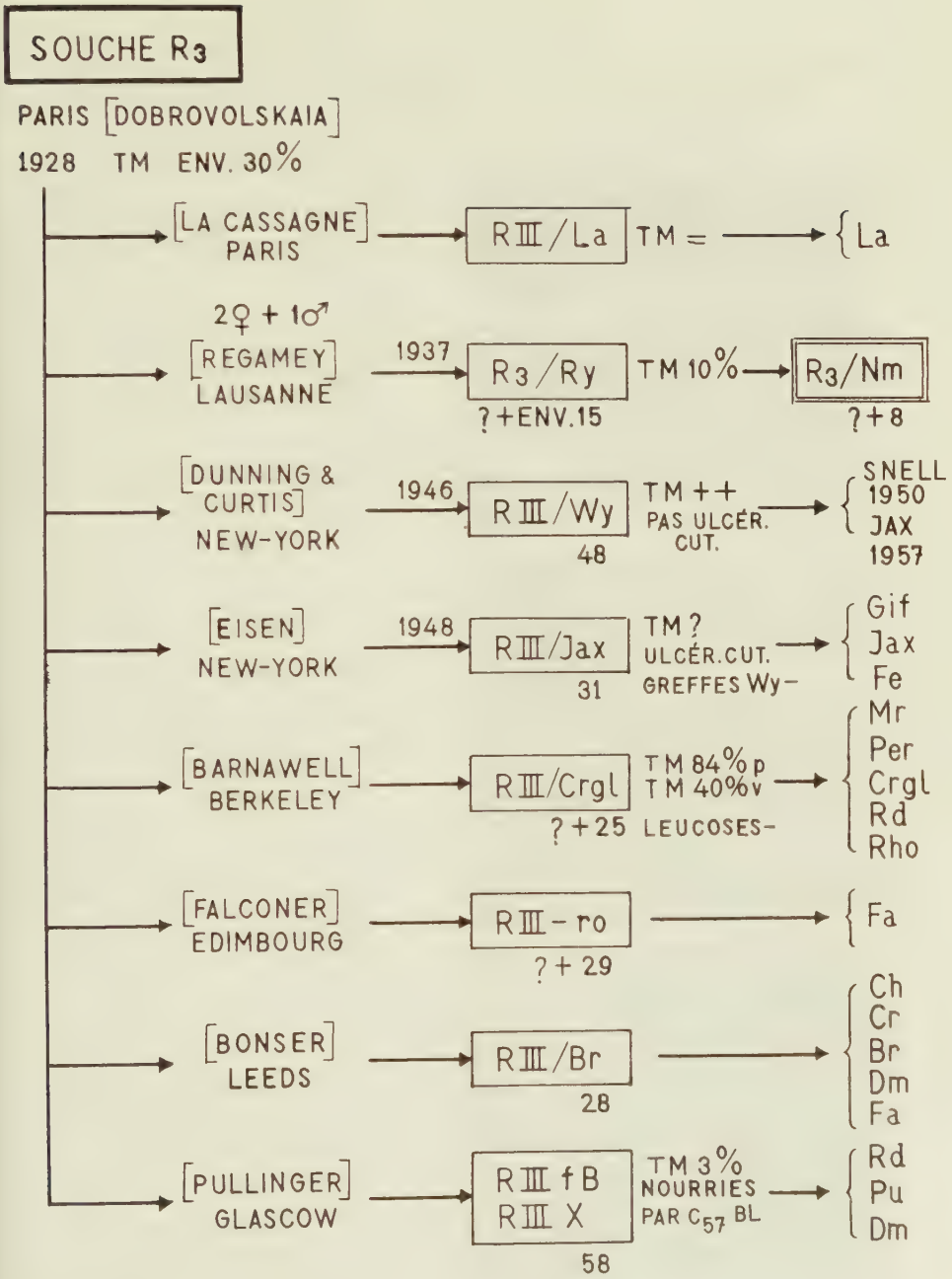
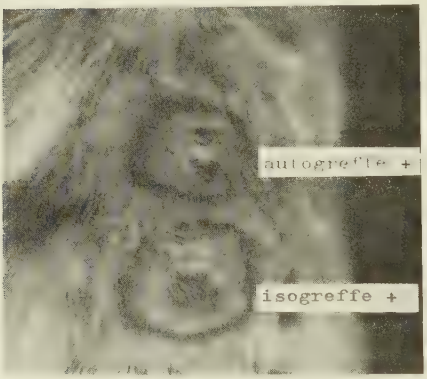


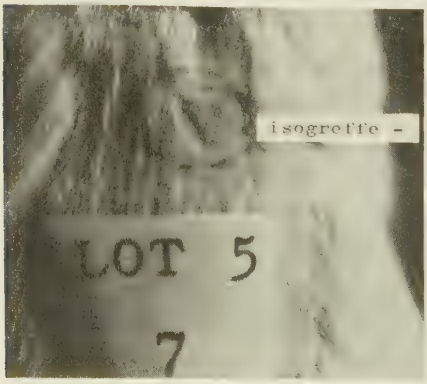

Figure I. 2.:
Arbre généalogique de notre souche R 3/Nm établi d'après Staats (114) par Neukomm en 1964. (voir légende Fig. I.1.)
La souche R 3/Nm en est actuellement à sa 22$^{e}$ génération.

Figure I. 3. : Greffes de peau permettant de tester la pureté de nos souches.




a. Souche SwE/Nm

b. Souche R 3/Nm




c. Vérification de la différence entre les souches SwE/Nm et R3/Nm .

Pour les besoins de notre recherche, une série importante de couples "frère-soeur" âgés de trois mois ont été mis en reproduction simultanément. Nous avons réparti les souriceaux issus de la première et de la deuxième nichée, dans les divers lots en vertu de critères imposés par la statistique.

Tableau I. 2.: Fréquence (%) des tumeurs spontanées des souris des souches SwE/Nm et R3/Nm (écart type)

| CANCERS | SwE/ Nm | | | | R3 /Nm | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | o/o | | Latence Jours | | o/o | | Latence Jours | |
| | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ | ♂ | ♀ |
| Lymphomes | 24 | 29 | 597 (196) | 725 (139) | 50 | 59 | 500 (120) | 594 (129) |
| Adénocarcinomes pulmonaires | 35 | 22 | 761 (142) | 674 (167) | 14 | 11 | 562 (169) | 626 (137) |
| Adénocarcimones mammaires | 1 | 4 | 857 | 743 (213) | - | 8 | - | 460 (145) |
| Carcinomes du pancréas | - | 1 | - | 516 | - | 1 | - | 345 |
| Carcinomes de l'intestin | - | 1 | - | 610 | 1 | - | 589 | - |
| Epithéliomas épidermiques | - | - | - | - | 1 | 1 | 377 | 704 |
| Sarcomes musculaires | 1 | 7 | 873 | 685 (160) | 1 | 1 | 622 | 751 |
| Hépatomes | 2 | - | 789 (52) | - | 1 | - | 754 | - |
| Réticulosarcomes | 6 | 2 | 804 (152) | 879 (30) | - | - | - | - |

2.1.1. Exigences de la statistique

Dans le domaine de la recherche, la mise en évidence d'un phénomène biologique est dépendante de l'analyse statistique des résultats obtenus. Il est donc nécessaire de préparer l'expérimentation avec soin pour qu'elle obéisse aux trois principes suivants:

1. Sa dimension doit être suffisante, car la répétition d'une mesure sur un matériel abondant, augmente la précision, pour autant que l'on ne diminue pas l'homogénéité du matériel à mesure que l'on en accroît la quantité.
2. l'expérience présente le maximum d'efficacité quand le nombre d'individus est égal dans chaque groupe expérimental.
3. Les tests statistiques ne sont valables que si aucun groupe expérimental ne subit d'influence systématique. Lorsqu'on a à faire à des facteurs de non-homogénéité que l'on peut contrôler (souches, âge, sexe), il suffit de répartir le matériel en blocs casualisés pour ne pas biaiser les résultats ( 67 ).

Dans notre expérience nous répartirons les deux sexes de nos deux souches de souris, en blocs casualisés qui subiront divers traitements. Nous pourrons alors procéder à une analyse de variance qui a l'avantage de réduire l'erreur expérimentale.

Afin de minimiser les variations dues aux répétitions des manipulations, les colorations en vue des différents dosages histochimiques s'effectueront sur des groupes d'animaux, dans lesquels chaque traitement sera représenté de manière égale. Lors de l'analyse statistique, ces groupes seront considérés comme blocs casualisés. Les données perdues par accident seront évaluées à l'aide de la formule de YATES ( 67 ).

Le plan d'analyse général se présentera comme suit :

1. Analyse de variance globale des résultats en fonction des souches, des sexes et des traitements. (Analyse à deux variables avec répétition : les colonnes sont formées par les souches et les sexes, les lignes par les traitements, et les répétitions par les 20 animaux de chaque lot).
2. Comparaisons orthogonales entre les souches et les sexes (même analyse que sous 1., dédoublée).
3. Analyse de variance globale en fonction des traitements et des badigeonnages (analyse à deux variables : les colonnes sont formées par les badigeonnages et les lignes par les traitements).
4. Comparaisons orthogonales des traitements entre eux (même analyse que sous 3., en considérant les traitements 2 à 2 ou 3 à 3 etc..)

2.1.2. Formation des lots

480 jeunes souris âgées de 10 à 14 semaines sont réparties en lots de 20, par sexe et par souche. Les âges et les nichées au sein d'une même souche, et pour un sexe donné, ont été casualisés de telle façon que l'âge moyen des animaux soit le même dans chaque lot. Nous obtenons ainsi :

1 famille de 6 lots de 20 souris SwE/Nm ♂ âgées de 3 mois
1 famille de 6 lots de 20 souris SwE/Nm ♀ âgées de 3 mois
1 famille de 6 lots de 20 souris R 3/Nm ♂ âgées de 3 mois
1 famille de 6 lots de 20 souris R 3/Nm ♀ âgées de 3 mois

Qui sont logées dans des cages en "Makrolon" à raison d'un lot par cage, les traitements étant distribués par la suite au hasard dans chaque famille.

2.1.3. Conditions de vie au sein de l'animalerie

Nos animaux expérimentaux sont logés dans le local "Expérience" où ils sont contrôlés quotidiennement. Ils reçoivent de la nourriture (granulés pour souris Protector) et de l'eau ad libitum. La litière est constituée de sciure de bois blanc dépoussièrée (Sciure BM. Eplatures S.A.,La Chaux de Fonds). Nous plaçons un "château"(*) dans

(*) Petite cage en bois de 15 cm de côté et 10 cm de haut.

chaque cage servant d'abri aux animaux. Un rythme diurne-nocturne de 12 heures consécutives de lumière est assuré tout au long de l'année. La température moyenne des locaux est maintenue à 20°C et le taux d'humidité entre 50 et 60 % (125). Les cages sont nettoyées et désinfectées une fois par semaine en prenant des précautions spéciales pour le matériel souillé par les cancérigènes tels que le benzo (a)pyrène. Ce matériel est contremarqué, décontaminé spécialement avec du Contrad 90 (Technosa S.A.) et toujours réutilisé pour les mêmes animaux.

## 2.2. Choix des traitements

Parmi les nombreux tests de cancérisation existants (125), le badigeonnage de la peau a été la technique la plus usitée pour l'étude des goudrons et des cancérigènes chimiques responsables de tumeurs cutanées chez l'homme. Il présente l'avantage d'être d'exécution facile et de permettre l'observation macroscopique des papillomes et des épithéliomas tout au long du traitement sans sacrifier l'animal. La perméabilité de la peau aux divers solvants organiques tels que l'acétone, le toluène ou le benzène en ont fait un test tout indiqué pour l'étude des substances organiques lipophiles.

La durée des traitements qui portent souvent sur toute la vie de l'animal, leur répétition qui est fastidieuse, les quantités de matériel requises, les pertes des substances appliquées par frottement, grattage ou lèchage, ainsi que la mauvaise perméabilité de la peau à de grosses molécules organiques, sont les principaux inconvénients de ce test.

2.2.1. Méthodes de badigeonnage

Weisburger et Weisburger (125) recommandent d'utiliser une pipette pour déposer sur la peau du dos de l'animal un volume donné du produit à tester. Deux jours avant le traitement les animaux sont rasés au rasoir électrique.
L'acétone est utilisée préférentiellement comme véhicule des carcinogènes chimiques topiques pour deux raisons:

1. Sa volatilité qui facilite la pénétration du matériel par le canal du follicule pileux.

2. Son innoquité au niveau de l'épiderme et du derme.

Les auteurs préconisent un rythme de deux à trois traitements par semaine.

Major ( 71 ), étudie les changements précoces de la peau des souris badigeonnées avec divers composés chimiques. Il préfère utiliser des mâles, bien qu'ils soient plus agressifs et se blessent fréquemment par morsure dans la zone à badigeonner, plutôt que les femelles qui présentent des variations de sensibilité au niveau du follicule pileux en fonction de leur cycle oestral. Il choisit des animaux de trois mois ayant ainsi un système pileux en pleine maturité et il les badigeonne à heure fixe pour éviter les variations de l'index mitotique dues au rythme nycthéméral.

En conséquence, nous avons procédé comme suit:

Deux jours avant le premier badigeonnage, les souris des souches SwE/Nm et R3/Nm, mâles et femelles, âgées de trois mois sont rasées dans la partie supérieure du dos sur une surface de 3 $cm^2$, avec un rasoir électrique.

Elles sont traitées deux fois par semaine, le lundi et le jeudi entre 8 et 10 heures. Chaque dépôt, de 0,1 ml de solution par animal, est effectué à l'aide d'une seringue de verre de 1 ml, au milieu de la zone rasée. Les animaux sont ventilés 5 minutes dans une cage perforée, placée dans une chapelle construite pour cet usage,puis remis à l'animalerie.

2.2.2. Phénomène de cancérisation

La littérature abonde sur les tests de cancérisation de la peau de la souris avec les produits les plus divers ( 5 )( 19 )( 24 )( 28 )( 33 )( 58 )( 63 )(64). Les conditions expérimentales dans lesquelles ces tumeurs cutanées apparaissent sont clairement établies. Schmidt, Schmähl et Misfeld (104)montrèrent que les souris Swiss et NMRI étaient particulièrement sensibles au benzo-(a)pyrène, puisque ces animaux réagissent à des doses de 1,2 et 1,7 µg par badigeonnage respectivement, en formant 20% de cancers. Wynder et coll.(128) administrèrent ce même cancérigène à des doses croissantes de 0,001 à 0,5% à trois souches de souris ainsi qu'à des lapins. Ils constatèrent que le lapin est moins sensible que les souris qui elles,réagirent de façon semblable. La latence d'apparition des tumeurs fut fonction inverse de la concentration de cancérigène.
Lee et Peto ( 59 ) ainsi que Roe et coll. ( 95 ) démontrèrent que l'âge auquel les badigeonnages débutent n'a pas d'influence sur la fréquence, ni la latence d'apparition des tumeurs.

Dans une expérience préliminaire, nous avons badigeonné des souris de nos deux souches, afin de tester leur sensibilité à un cancérigène fort, le benzo(a)-pyrène (Koch-Light LTD) dans les conditions suivantes :

- Animaux traités : 20 ♂ et 20 ♀ SwE
  20 ♂ et 20 ♀ R3
- Rasage : au rasoir électrique 2 jours avant le premier badigeonnage
- Badigeonnages : 2 fois par semaine avec 0,1 ml de solution acétonique (Merck) de benzo(a)pyrène à la concentration de 0,5%.

Les papillomes et les épithéliomas sont dénombrés sur la base des critères macroscopiques suivants:

- Papillome : petite excroissance régulière, lisse, de diamètre et d'épaisseur inférieurs à 1 mm.
- Epithélioma : papillome ayant évolué et présentant un aspect irrégulier, bosselé, de diamètre et d'épaisseur supérieur à 1 mm avec hyperkérastose, voire nécrose.

Nous constatons que tous les animaux, dès le troisième badigeonnage, perdent systématiquement leurs poils par plaque dans la zone traitée. La peau alopécique est rouge, épaisse et recouverte de pellicules. Les papillomes apparaissent alors très rapidement et en très grand nombre. Seuls quelques-uns d'entre-eux évoluent en cancer, les autres régressent ou se desquament (fig.I.4.). Les fréquences d'apparition de ces lésions, qui sont reportées dans les figures I.5. et I.6., montrent que notre souche Swiss est beaucoup plus sensible au benzopyrène (latence d'apparition moyenne des épithéliomas de 6 semaines environ) que dans la souche R 3 (latence moyenne de 17 semaines) où le phénomène de papillomatose se fait en deux phases distinctes avec une forte régression au dixième badigeonnage.

Figure I. 4.: Aspect des lésions constatées lors du badigeonnage au 3,4-benzo(a)pyrène.

a. 3e badigeonnage : forte alopécie

b. 13e badigeonnage : souche SwE, apparition des épithéliomas.

c. 30e badigeonnage : souche R3, apparition des épithéliomas.

Figure I. 5.: Fréquence d'apparition des papillomes et des épithéliomas chez des souris SwE en fonction des badigeonnages au B(a)P.

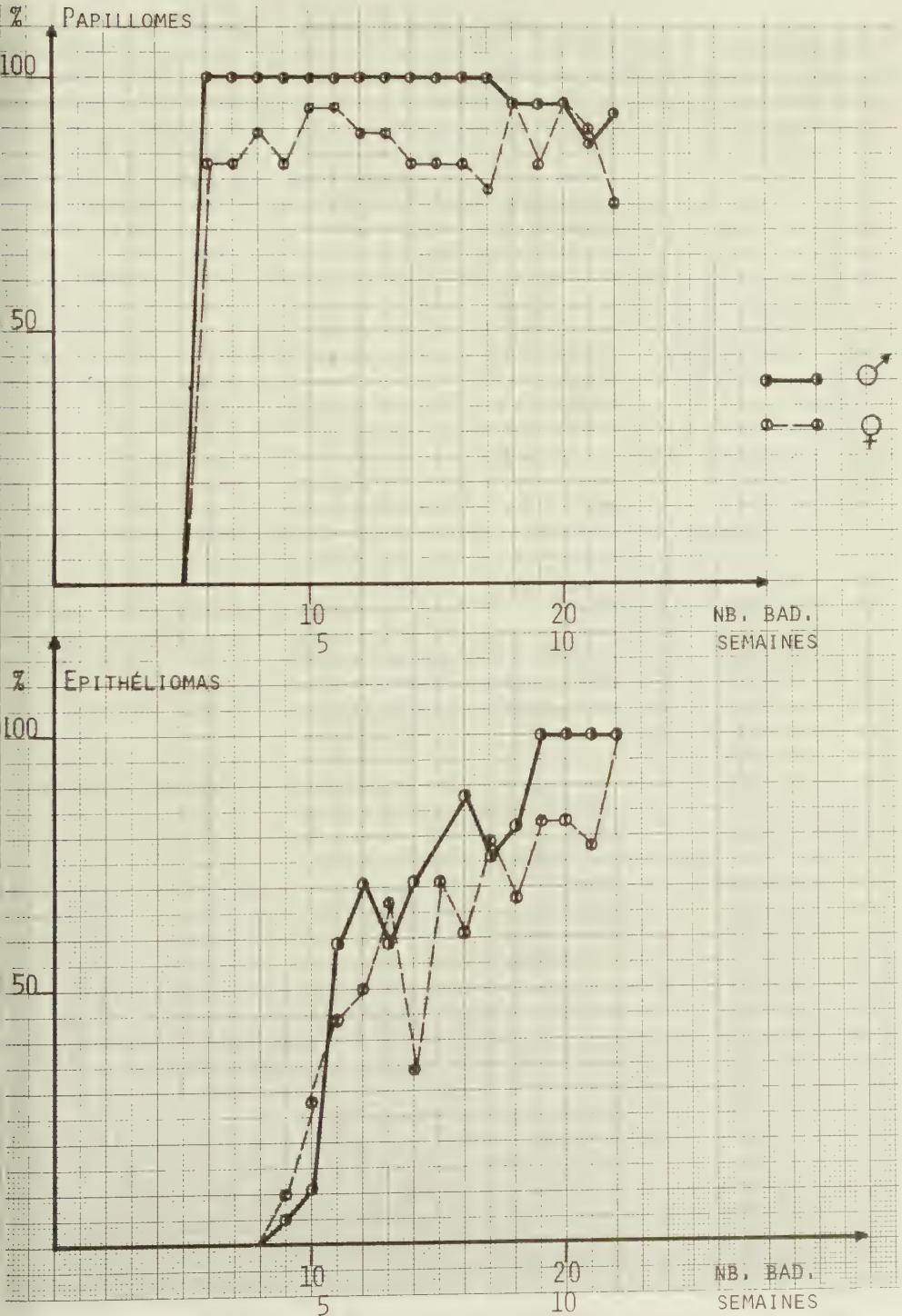
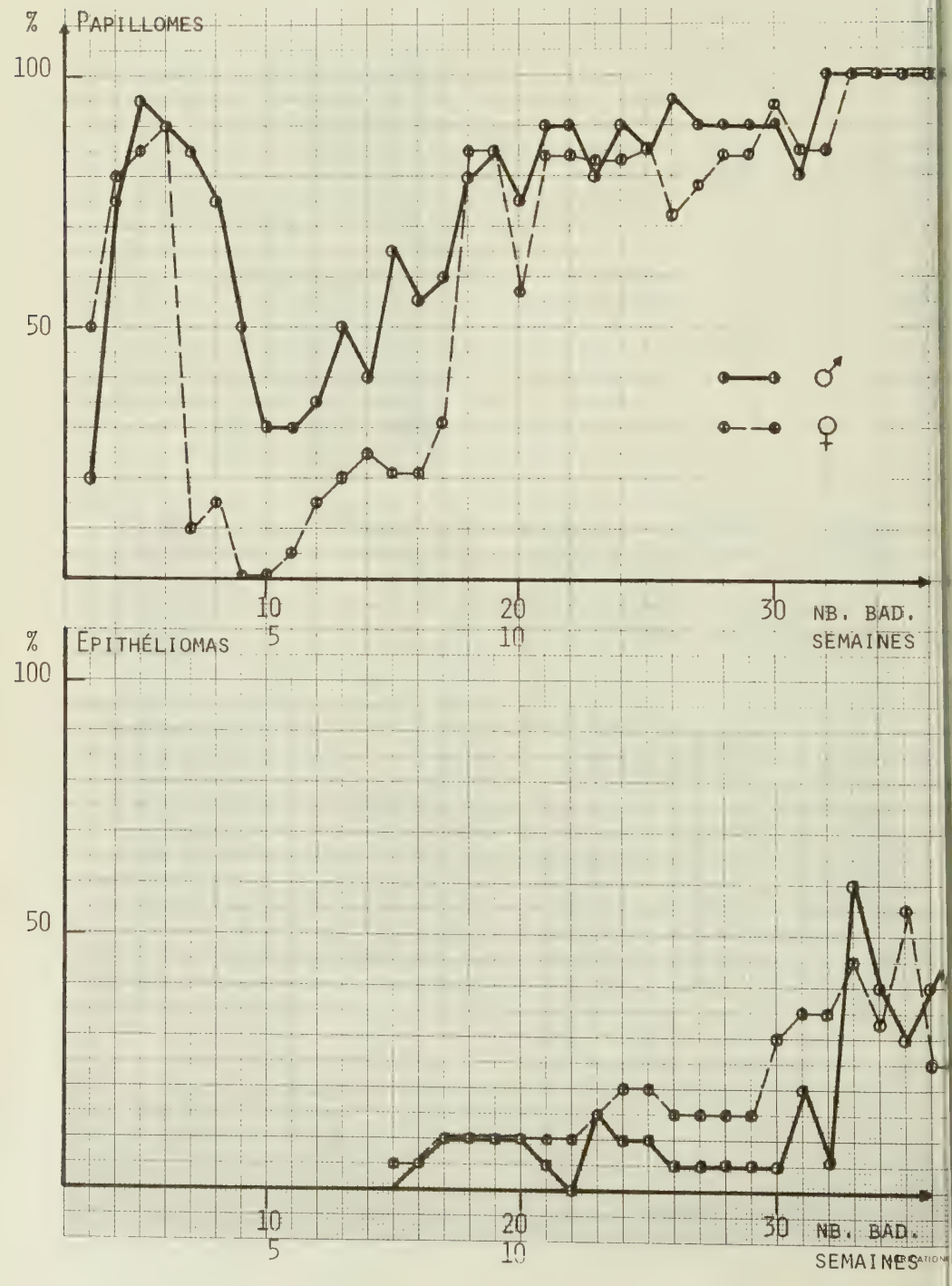


Figure I. 6.: Fréquences d'apparition des papillomes et des épithéliomas chez des souris R3 en fonction des badigeonnages au B(a)P.



2.2.3. Phénomène de cocancérisation

En 1941, déjà, Berenblum ( 7 ) démontra que la cancérisation pouvait se réaliser en deux phases distinctes : une phase d'initiation, suivie d'une phase de promotion.
Diverses expériences en vue de vérifier cette théorie ont permis la découverte de nombreux agents faiblement cancérigènes, et ont ouvert une voie nouvelle à la recherche des mécanismes de la cancérogénèse (101).

Nous avons repris cette technique dans notre expérimentation :

- La phase d'initiation sera assurée par un seul badigeonnage de 500 µg de benzo (a) pyrène sur le dos rasé de nos souris.

- La phase de promotion correspondra à un traitement continu à l'huile de croton dont la concentration sera déterminée suivant la techinque de Hecker ( 47 ):

Des souris mâles et femelles âgées de trois mois au moins, reçoivent sur l'oreille gauche 6 µl d'une solution acétonique d'huile de croton. L'oreille droite intacte sert de témoin pour évaluer le degré de rougeur de l'oreille traitée. Nous préparons 5 solutions, dont la concentration en huile de croton fraîche (103) (Schuchart), suit une progression géométrique de raison 2.

Vingt-quatre heures après l'application de l'irritant, les oreilles traitées montrent divers degrés de réaction qui peuvent être diagnostiqués comme suit :

* Légère rougeur des vaisseaux sanguins sans rougeur des surfaces voisines

** Rougeur marquée des vaisseaux sanguins avec début de rougeur des surfaces voisines. C'est la dose à choisir.

*** Rougeur intense de l'oreille avec hyperplasie éventuelle.

Tableau I. 3.: Estimation de la dose optimale d'huile de croton à administrer lors de la promotion tumorale.

| SOURIS N° | µg.d'huile de croton par oreille | RESULTATS : | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ♂ E | ♀ E | ♂ R 3 | ♀ R 3 |
| 1 | 0,6 | - | - | - | - |
| 2 | 1,2 | * | * | * | * |
| 3 | 2,4 | ** | ** | * | * |
| 4 | 4,8 | *** | ** | ** | * |
| 5 | 9,6 | *** | *** | ** | ** |
| 6 | Acétone | - | - | - | - |

Au vu des résultats donnés dans le tableau I.3. nous avons choisi la dose 2,4 µg, qui correspond à une concentration approximative de 0,05 % d'huile de croton, et qui est à même d'assurer la promotion tumorale dans nos deux souches.

2.2.4. Choix des témoins

Comme tous les traitements sont exécutés avec des solutions acétoniques, nous avons prévu de badigeonner une série de nos animaux avec l'acétone seule (p.a. Merck). Nous étudierons également l'effet traumatique du rasage dans un lot qui ne subira que cette manipulation et ne sera pas badigeonné.

2.2.5. Résumé des traitements effectués

Chaque famille décrite sous 2.1.2. recevra une série de six traitements (tableau I.4.)

Traitement R : (témoin)
- rasage
- pas de badigeonnage

Traitement T : (témoin)
- rasage
- badigeonnages à l'acétone (p.a. Merck), à raison de 0,1 ml 2 fois par semaine.

Traitement P : (cancérisation)
- rasage
- badigeonnages avec une solution acétonique de benzo(a)pyrène (Koch-Light) 0,5 %, à raison de 0,1 ml deux fois par semaine. (B(a)P)
- dose reçue par badigeonnage : 500 µg

Traitement PH: (cocancérisation)
- rasage
- premier badigeonnage avec la solution acétonique de benzo(a)pyrène : 500 µg.
- badigeonnages suivants exécutés avec l'huile de croton acétonique fraîche (Schuchart) à la concentration de 0,05%, à raison de 0,1 ml deux fois par semaine.

Traitement H : (promotion)
- rasage
- badigeonnages avec une solution de 0,05% d'huile de croton acétonique fraîche à raison de 0,1 ml 2 fois par semaine.

Traitement C : (initiation)
- rasage
- badigeonnage avec un cancérigène faible, la 3,4-benzacridine (Koch-Light)(bac) à la concentration de 0,5%, à raison de 0,1 ml deux fois par semaine.
- dose reçue par badigeonnage: 500 µg

Toutes ces solutions sont préparées au début des badigeonnages et sont conservées au réfrigérateur à 4°C à l'abri de la lumière. Les solutions de cancérigènes et d'huile de croton sont renouvelées une fois par mois.

Tableau I. 4.: Traitements.

| LOT | NOMBRE TOTAL D'ANIMAUX | | | | TRAITEMENTS |
|---|---|---|---|---|---|
| | SWE ♂ | SWE ♀ | R3 ♂ | R3 ♀ | |
| R | 20 | 20 | 20 | 20 | Rasage<br>pas de badigeonnage |
| T | 20 | 20 | 20 | 20 | Badigeonnages à l'acétone |
| P | 20 | 20 | 20 | 20 | Badigeonnages au B(a)P |
| PH | 20 | 20 | 20 | 20 | Badigeonnage au B(a)P,<br>puis à l'huile de croton |
| H | 20 | 20 | 20 | 20 | Badigeonnages à l'huile<br>de croton |
| C | 20 | 20 | 20 | 20 | Badigeonnages à la bac |

2.2.6. Exécution des autopsies

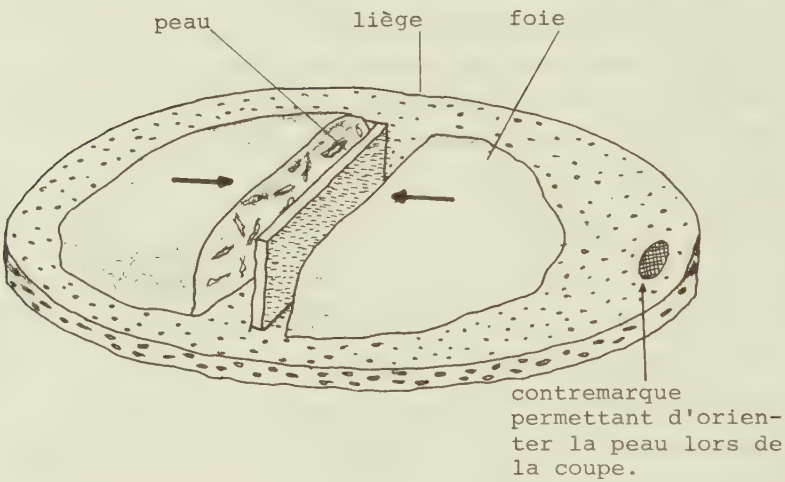
Afin de détecter les modifications précoces des substances que nous allons doser au niveau de la

peau, en fonction de la cancérisation, nous avons décidé de sacrifier un animal de chaque lot 24 heures après chaque badigeonnage entre 8 h et 10 h (71).
A partir du 12$^{e}$ badigeonnage, qui correspond à la latence d'apparition des tumeurs de la souche SwE, ces prélevements ne seront effectués que tous les deux badigeonnages, jusqu'à épuisement des lots.

Les autopsies seront toujours exécutées suivant le même protocole:

- Sacrifice de l'animal par rupture cervicale.
- Coupe des poils aux ciseaux pour éviter d'endommager les épithéliomas éventuels.
- Prélèvement de la surface badigeonnée. Etalement sur une lame de verre. Fractionnement en 4 fragments égaux.
- Prélèvement de 4 morceaux de foie et du testicule (pour les mâles).
- Immersion d'un fragment de peau (collé sur une lamelle pour éviter son enroulement sur elle-même), d'un fragment de foie et du testicule, dans le liquide de Zenker (voir 3.3.2.)
- Préparation de 3 fragments de peau en vue de la congélation :
  chaque fragment de peau est mis en "sandwich" dans un morceau de foie (support) et déposé sur un disque de liège de 0,1 cm d'épaisseur et de 3 cm de diamètre (figure I.7.).
- Ces assemblages sont placés sous sachets plastic étanches et congelés rapidement dans un bain froid composé d'un mélange de neige carbonique et d'alcool absolu. Ces sachets sont conservés au congélateur à - 30 $^{o}$C.

Figure I. 7.: Préparation de la peau en vue de la congélation




## 3. METHODES HISTOCHIMIQUES

### 3.1. Introduction

L'histochimie a été considérée comme une science depuis les années 1830 déjà, ainsi que le relève Pearse dans son historique (88). Elle était pratiquée surtout par les botanistes, mais elle tomba en désuétude jusqu'à la fin du 19 ème siècle. Ce n'est qu'autour des années 1930 que Lison ramena cette science au grand jour. Depuis, les travaux publiés dans ce domaine n'ont fait que croître. Une étape importante a été franchie grâce aux recherches de Caspersson en 1936 (18) qui donnèrent naissance à l'histochimie quantitative moderne.

Nous basant sur le livre de Pearse, "Histochemistry-Theoretical and applied", nous avons recherché des méthodes quantitatives nous permettant de doser avec le microdensitomètre Vickers les 4 substances à étudier. Il s'agit du DNA et des histones au niveau du noyau épidermique, et des activités phosphatasiques acides et alcalines de la peau ( 88 ).

## 3.2. Microdensitomètre

Altmann ( 3 ) étudia les divers microdensitomètres existants dans le commerce jusqu'à ce jour. Il en présenta les avantages et les inconvénients.
Notre appareil "Vickers" est précis tout en étant relativement simple à manipuler. Il possède un système de scanning de l'objet, permettant de minimiser l'erreur due à l'hétérogénéité du matériel,et un mode de masquage qui supprimeles interférences dues à la brillance du verre.

### 3.2.1. Description de l'appareil

Sous un aspect extérieur compact,(fig.I.8.), ce microdensitomètre intégrateur est construit suivant le système de Deeley( 25). Il est composé schématiquement d'un microscope dans lequel l'objet peut être masqué par un champ clair de diamètre variable. Cet objet est balayé (scanning) par un spot lumineux mobile, dont l'intensité est transmise à un photomultiplicateur. Il posséde trois sources lumineuses distinctes :

- Une lampe permettant l'illumination du champ total et de l'objet.
-Une lampe éclairant le champ du masque de taille variable.
-Une lampe munie d'un monochromateur éclairant le spot de dimension réglable.(fig.I.8. )

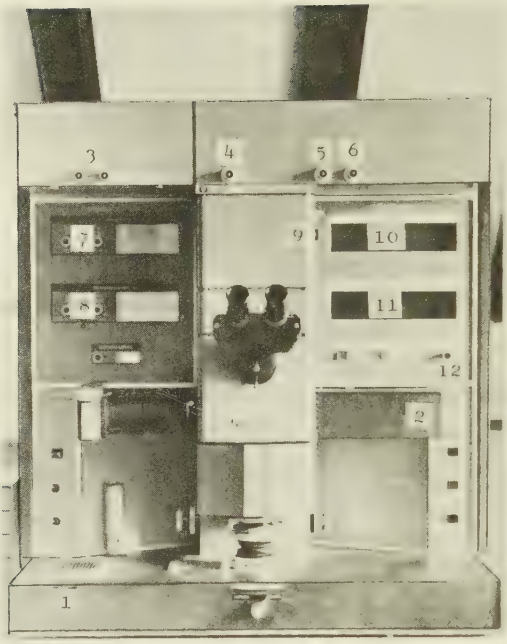



Figure I. 8. :

Microdensitomètre intégrateur VICKERS .

1. Lampe du microscope
2. Lampe du masque
3. Lampe du spot
4. W = réglage de la largeur de bande du monochromateur en u.a.
5. $\lambda$ = réglage de la longueur d'onde en u.a.
6. s = réglage de la dimension du spot
7. Tableau de densité dont l'échelle se règle en fonction de 8
8. Tableau de transmission que l'on règle à 100% en fonction d'un blanc (verre de la lame du microscope par exemple) et à 0% en empêchant mécaniquement la lumière de passer dans le photomultiplicateur.
9. Déplacement manuel du spot suivant les axes x et y
10. Affichage de la densité intégrée en u.a.
11. Affichage de la surface colorée intégrée en u.a.
12. Thr = réglage du seuil de densité en dessous duquel la mesure de surface ne s'effectue pas.

Les mesures d'absorbance en unités arbitraires (u.a.) se font au rythme de 10'000 par seconde, elles sont intégrées et affichées. La surface colorée de chaque objet est calculée automatiquement à partir d'un seuil de densité que l'on peut modifier.

3.2.2. Linéarité et reproductibilité

a. Linéarité de la réponse de l'intégrateur

Pour vérifier ce paramètre, nous mettons au point le microscope du Vickers selon un mode classique:

- Réglage du Koehler
- Diaphragmes de champ et du condenseur entièrement ouverts.
- Mise au point de la netteté avec un oculaire 10 x et un objectif 40 x sur le micromètre de la lame de référence .

Les mesures d'absorbance intégrée en u.a. se font avec un masque de surface fixe et sur un filtre gris-neutre. Le spot $N^{O}2$ est placé manuellement dans le masque,et l'absorbance est réglée artificiellement au tableau 7 (fig. I.8.) sur des valeurs successives couvrant toute l'échelle (tableau I.5.).

Nous constatons (fig. I.9.) que la réponse de l'intégrateur est linéaire. La droite de régression dont l'équation est $y= 80,40x - 2,31$ a un coefficient de corrélation $r = 0,992$.

Figure I. 9.: Etude de la linéarité de la réponse de l'intégrateur du "Vickers", en fonction de l'absorbance réelle donnée par le densitomètre.

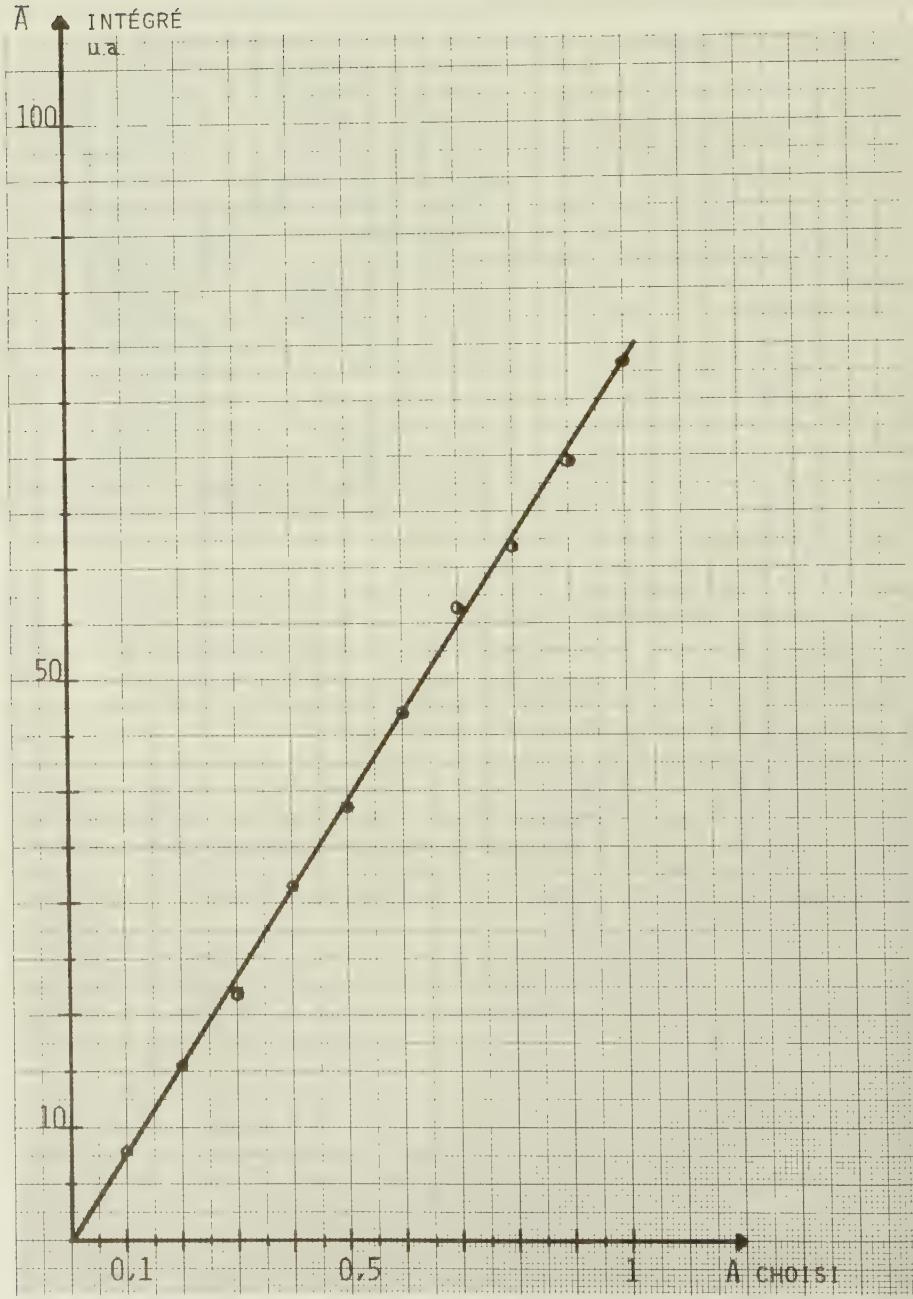


Tableau I.5.: Vérification de la linéarité de la réponse de l'intégrateur (moyennes calculées sur 10 mesures intégrées).

| ABSORBANCE CHOISIE | ABSORBANCE INTEGREE MOYENNE $\bar{A}$ u.a. | | S= ECART TYPE |
|---|---|---|---|
| 0,1 | 7,98 | ± | 0,38 |
| 0,2 | 15,46 | ± | 0,43 |
| 0,3 | 21,98 | ± | 0,52 |
| 0,4 | 31,28 | ± | 0,94 |
| 0,5 | 38,83 | ± | 0,66 |
| 0,6 | 47,22 | ± | 0,28 |
| 0,7 | 56,43 | ± | 0,36 |
| 0,8 | 61,80 | ± | 0,70 |
| 0,9 | 69,72 | ± | 0,52 |
| 1,0 | 78,40 | ± | 0,30 |

b. Reproductibilité des mesures au cours du temps

Une même mesure a été exécutée à différentes heures de la journée, cinq jours consécutifs sur un filtre opaque afin d'estimer les variations de la réponse de l'appareil en fonction du temps.
Nous nous plaçons dans les mêmes conditions de réglage que sous a., en fixant l'absorbance choisie à 1. Les résultats sont reportés dans le tableau I.6.

En effectuant dix mesures consécutives sans toucher aux réglages de l'appareil, nous constatons

que la variation relative des résultats est voisine de 0,4% et qu'elle ne dépend ni du jour, ni de l'heure de la mesure. Cette fluctuation est acceptable en vertu du mode d'emploi de l'appareil, elle est due au bruit de fond du système électronique.

L'erreur de 1,1% environ que l'on constate lors des répétitions des mesures provient certainement de modifications incontrôlables des réglages de l'appareil (jeu des boutons), dont nous devrons tenir compte par la suite.

Tableau I. 6.: Etude de la reproductibilité des mesures au Vickers en fonction des heures et des jours de mesures.

$\bar{A}$ = absorbance moyenne intégrée calculée sur 10 mesures (u.a.)

Erreur % = $\frac{s}{\bar{A}}$

s = écart type

| JOURS | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | | MOYENNES | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| HEURES | $\bar{A}$ | % | $\bar{A}$ | % | $\bar{A}$ | % | $\bar{A}$ | % | $\bar{A}$ | % | $\bar{A}$ | % |
| 8 | 80,56 | 0,3 | 79,89 | 0,5 | 80,69 | 0,4 | 79,96 | 0,4 | 79,38 | 0,5 | 80,10 | 0,7 |
| 9 | 80,33 | 0,3 | 79,42 | 0,3 | 80,36 | 0,4 | 78,67 | 0,3 | 80,24 | 0,2 | 79,80 | 0,9 |
| 10 | 80,40 | 0,5 | 79,52 | 0,5 | 79,38 | 0,4 | 80,19 | 0,5 | 78,10 | 0,4 | 79,51 | 1,1 |
| 11 | 79,60 | 0,4 | 78,15 | 0,5 | 79,08 | 0,5 | 80,61 | 0,4 | 78,07 | 0,3 | 79,10 | 1,3 |
| 14 | 79,28 | 0,4 | 77,97 | 0,4 | 79,47 | 0,3 | 79,00 | 0,3 | 77,94 | 0,4 | 78,73 | 0,9 |
| 15 | 79,32 | 0,4 | 78,29 | 0,4 | 78,42 | 0,3 | 81,08 | 0,6 | 78,51 | 0,4 | 79,12 | 1,5 |
| 16 | 78,47 | 0,4 | 78,82 | 0,3 | 78,59 | 0,3 | 79,32 | 0,4 | 81,19 | 0,4 | 79,28 | 1,4 |
| 17 | 79,30 | 0,2 | 77,95 | 0,4 | 78,88 | 0,6 | 78,26 | 0,4 | 79,31 | 0,2 | 78,74 | 0,8 |
| MOYENNE | 79,66 | 0,9 | 78,75 | 1,0 | 79,36 | 1,0 | 79,64 | 1,2 | 79,09 | 1,5 | | |

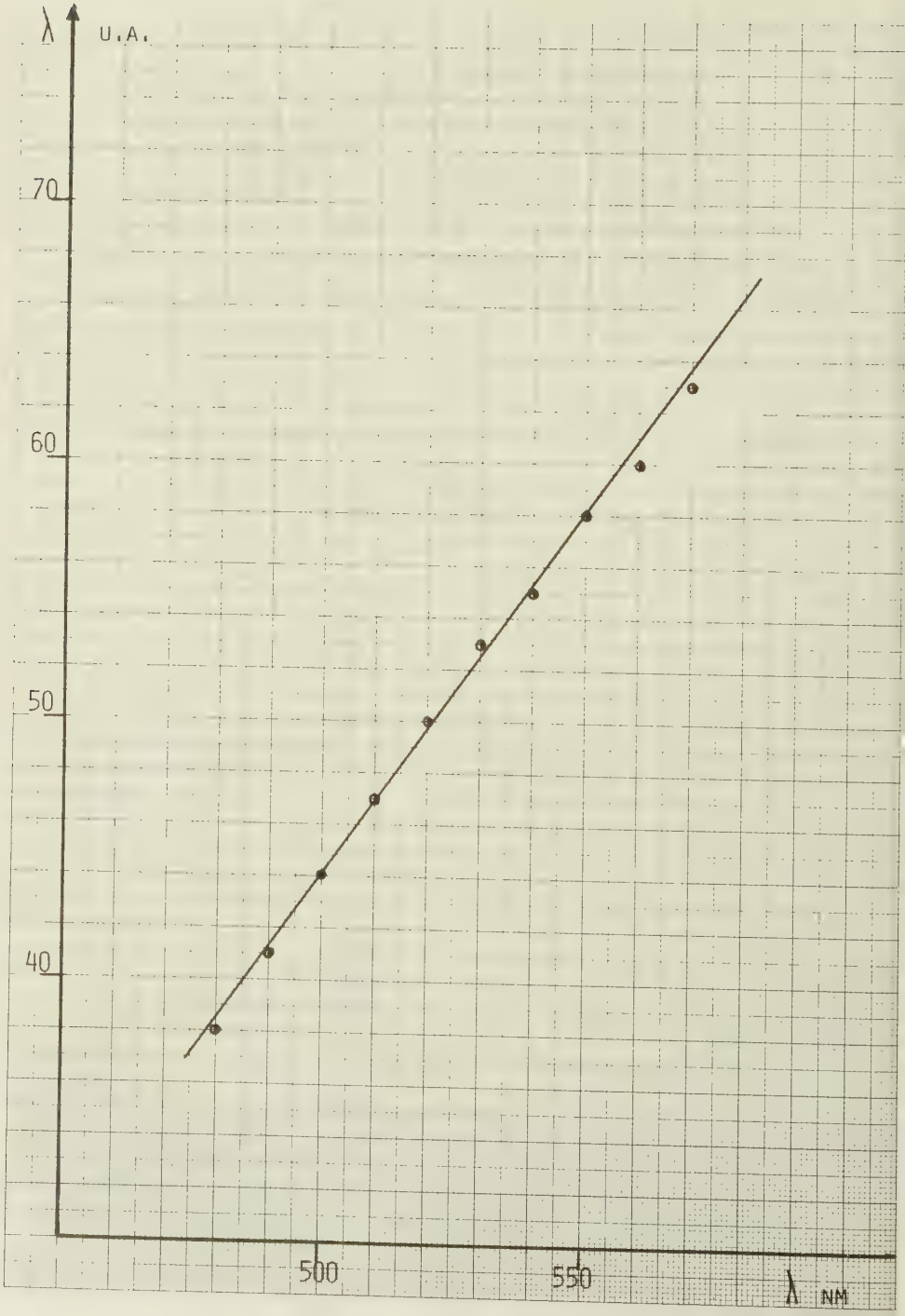
### 3.2.3. Etalonnage du monochromateur

Nous étalonnons le bouton gradué de 30 à 70 u.a. à l'aide d'un spectroscope adaptable à la place d'un oculaire du microscope. Nous choisissons un petit spot et évaluons sa longueur d'onde réelle en le superposant à l'échelle du spectroscope. En exprimant la longueur d'onde réelle en fonction de la valeur donnée par le bouton, nous obtenons une droite dont l'équation est $y = 0,28x - 93,87$ avec un coefficient de régression $r = 0,999$ (tableau I.7. et figure I.10.)

Tableau I. 7.: Etalonnage du monochromateur du Vickers

| LONGUEUR D'ONDE U.A. | LONGUEUR D'ONDE NM |
|---|---|
| 38 | 480 |
| 41 | 490 |
| 44 | 500 |
| 47 | 510 |
| 50 | 520 |
| 53 | 530 |
| 55 | 540 |
| 58 | 550 |
| 60 | 560 |
| 63 | 570 |

Figure I. 10.: Etalonnage du monochromateur



## 3.3. Technique de Feulgen pour le dosage du DNA

### 3.3.1. Introduction

L'étude historique de la réaction introduite par Feulgen et Rossenbeck en 1924, a été fort bien faite par Kasten en 1964 ( 52). Cette réaction est spécifique du DNA, lorsque ce dernier a subi une hydrolyse par un acide (HCl), qui met en évidence les groupements aldéhydiques présents au niveau du désoxyribose. Ces éléments sont alors colorés en pourpre par le réactif Schiff. Le temps d'hydrolyse optimal dépend de la normalité de l'acide, de la température du bain et du fixateur histologique utilisé.

Le problème de la spécificité de la réaction de Feulgen a été très controversé. Pearse dans son introduction ( 88 ) aboutit à la conclusion que cette réaction reste valable, malgré le conflit dont elle a été l'objet. Elle peut être utilisée avec confiance, en vue de dosages histochimiques quantitatifs, pour autant que l'on se place dans des conditions expérimentales bien déterminées.

Cowden et Curtis en 1975 ( 21 ), firent une étude comparative des quatre méthodes de dosages cytochimiques du DNA, qui sont considérées actuellement comme stoechiométriques. Il s'agit du Feulgen, de la réaction "gallocyanine-chromalun", à la suite d'un traitement à la RNA-ase, du bleu de méthylène à pH4 après RNA-ase et du vert de méthyle en présence de chlorure de Mn 2M. Dans leur conclusion, ces auteurs recommandent l'utilisation du Feulgen pour l'étude des désoxyribonucléoprotéines des noyaux interphasiques seulement, car cette réaction est influencée par l'organisation et la condensation de la chromatine. Le vert de méthyle qui n'a pas ce désavantage, leur semble plus utile pour l'estimation du DNA total de n'importe quel noyau.

Nous utiliserons cependant, la coloration de Feulgen dans des conditions d'hydrolyse bien déterminées et nous estimerons la quantité de DNA des noyaux interphasiques.

3.3.2. Choix du fixateur

D'après Pearse ( 88 ), n'importe quel fixateur, hormis le Bouin(qui entraîne une hydrolyse préalable des tissus trop forte), donne une coloration de Feulgen correcte pour un temps d'hydrolyse déterminé. Nous avons choisi le liquide de Zenker, car il présente l'avantage de permettre la coloration des histones comme nous le verrons plus tard. Il se prépare de la manière suivante:

Pour un litre de solution mère, dissoudre à chaud:

| | |
|---|---|
| - Chlorure mercurique (Merck) | 50 g |
| - Bichromate de K (Merck) | 25 g |
| - Sulfate de Na (Merck) | 10 g |
| - Eau distillée | ad 1000 ml |

au moment de la fixation, nous mélangeons :

| | |
|---|---|
| - Solution mère | 95 ml |
| - Acide acétique glacial (Merck) | 5 ml |

3.3.3. Etude de l'optimum d'hydrolyse

C'est le point le plus critique de cette coloration. Une étude détaillée de la concentration d'acide (HCl) et de la température optimales à utiliser en présence d'un fixateur donné a été faite par Fand (36 ). Elle aboutit à la conclusion que l'intensité de coloration la plus forte est obtenue avec un acide chlorhydrique à 3,5 N et une température de 37°C. Dans ces conditions, nous avons le meilleur compromis entre la mise en évidence du plus grand nombre de groupements aldéhydiques et l'extraction ou la destruction du DNA par l'acide.

Nous plaçant dans ces conditions d'hydrolyse, nous avons dû déterminer le temps optimal pour des tissus de souris fixés au liquide de Zenker.

Cette étude a été réalisée sur un fragment de peau de la manière suivante:

- Fixation au liquide de Zenker : 8 heures
- Lavage à l'eau courante : 12 heures
- Deshydratation et emparaffinage avec un automate "Histokinette" (MSE,Zivy)
- Exécution de coupes de 7 microns avec un microtome Minot
- Collage et montage de 20 lames à raison de 2 coupes par lame, à l'eau albuminée, sur des platines chauffantes.
- Déparaffinage par 3 bains de xylène successifs de 5 minutes.
- Réhydratation avec des alcools de concentration décroissante.
- Elimination des précipités mercuriels par réaction avec l'alcool iodé (iode bisublimé p.a. Merck : 10 g + 150 ml d'alcool 96$^{o}$)
- Elimination de l'iode par lavage à l'hyposulfite de Na (Merck) à 3 %
- Rinçage des coupes 10 minutes à l'eau distillée.
- Coloration de Feulgen suivant la technique décrite sous 3.3.4., avec des temps d'hydrolyse variants de 10 à 50 minutes
- Montage des coupes colorées à l'Eukitt (O. Kindler)

Les dosages du DNA nucléaire sont exécutés au Vickers à une longueur d'onde calibrée préalablement pour la coloration pourpre que nous obtenons (fig. I.11.) et avec les réglages suivants de l'appareil:

- Objectif 40x
- Spot n° 2
- Masque 15 microns de diamètre
- Longueur d'onde 540 nm (55 u.a.)
- W = 85 u.a.
- Thr = 0,1

Nous mesurons 20 noyaux interphasiques de la couche basale de l'épiderme et calculons la valeur moyenne de l'intensité de coloration qui correspond au rapport de l'absorbance intégrée en u.a. à la surface intégrée : $\frac{\bar{A}}{S}$ .
Nous constatons (tableau I.8.)(fig. I.12.) que le temps d'hydrolyse optimal se situe à 20 minutes environ.

Tableau I. 8.: Etude du temps optimal d'hydrolyse avec de l'HCl à 37°C sur des noyaux épidermiques de souris fixés au liquide de Zenker.

| MÂLES | | | FEMELLES | | |
|---|---|---|---|---|---|
| TEMPS D'HYDROLYSE | $\frac{\bar{A}}{S}$ | S (écart-type ) | TEMPS D'HYDROLYSE | $\frac{\bar{A}}{S}$ | S (écart-type ) |
| 5' | 1,42 | 0,29 | 7' | 1,87 | 0,31 |
| 10' | 2,04 | 0,34 | 12' | 2,00 | 0,38 |
| 15' | 2,33 | 0,31 | 17' | 2,11 | 0,38 |
| 20' | 2,28 | 0,34 | 22' | 2,20 | 0,26 |
| 25' | 2,35 | 0,33 | 27' | 2,02 | 0,25 |
| 30' | 2,21 | 0,35 | 32' | 2,28 | 0,23 |
| 35' | 2,20 | 0,46 | 37' | 2,12 | 0,28 |
| 40' | 2,20 | 0,24 | 42' | 2,07 | 0,29 |
| 45' | 2,22 | 0,42 | 47' | 1,90 | 0,34 |
| 50' | 2,15 | 0,28 | | | |

Figure I. 11.: Spectre d'absorption de la coloration de Feulgen exécuté sur le Vickers.

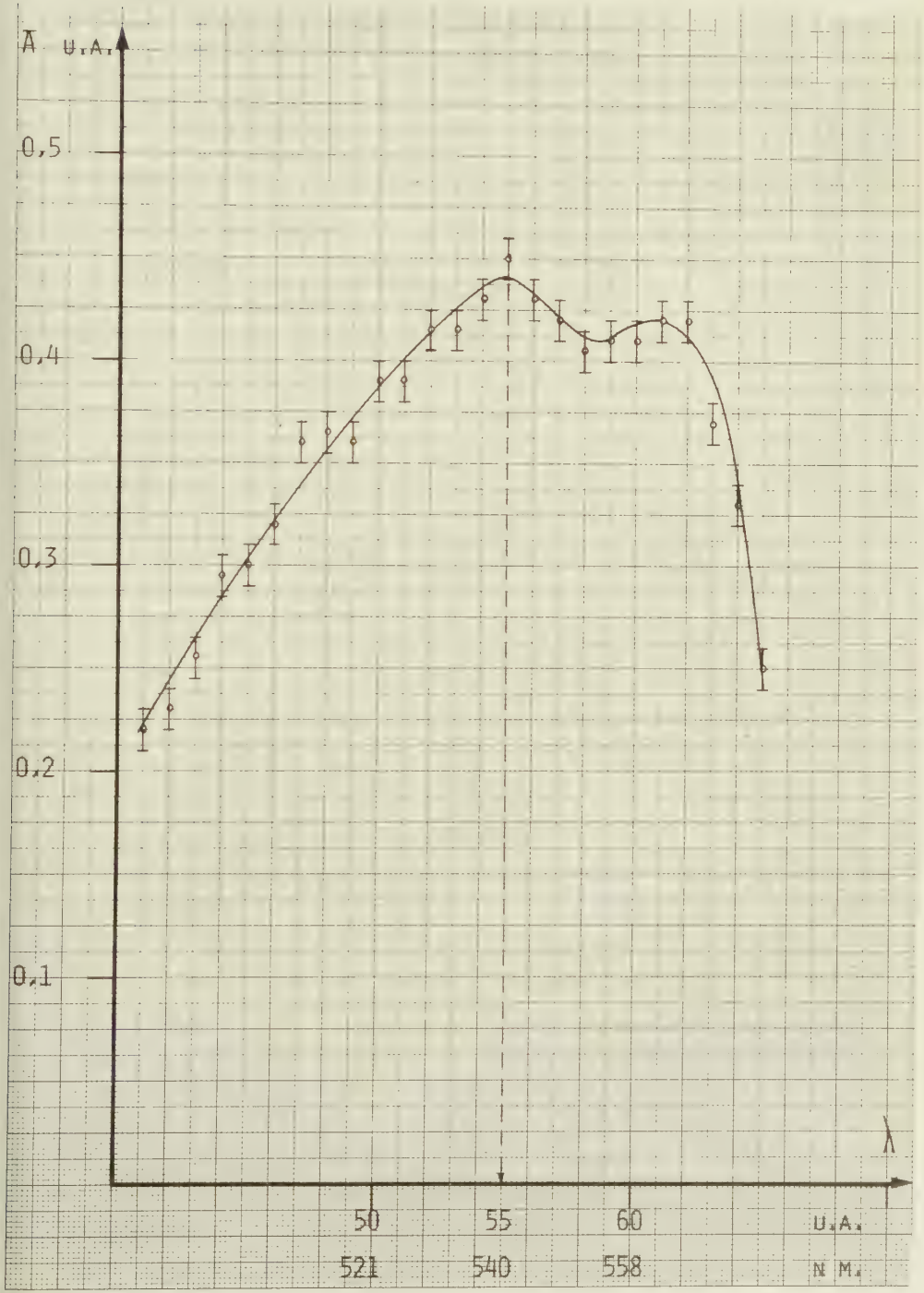
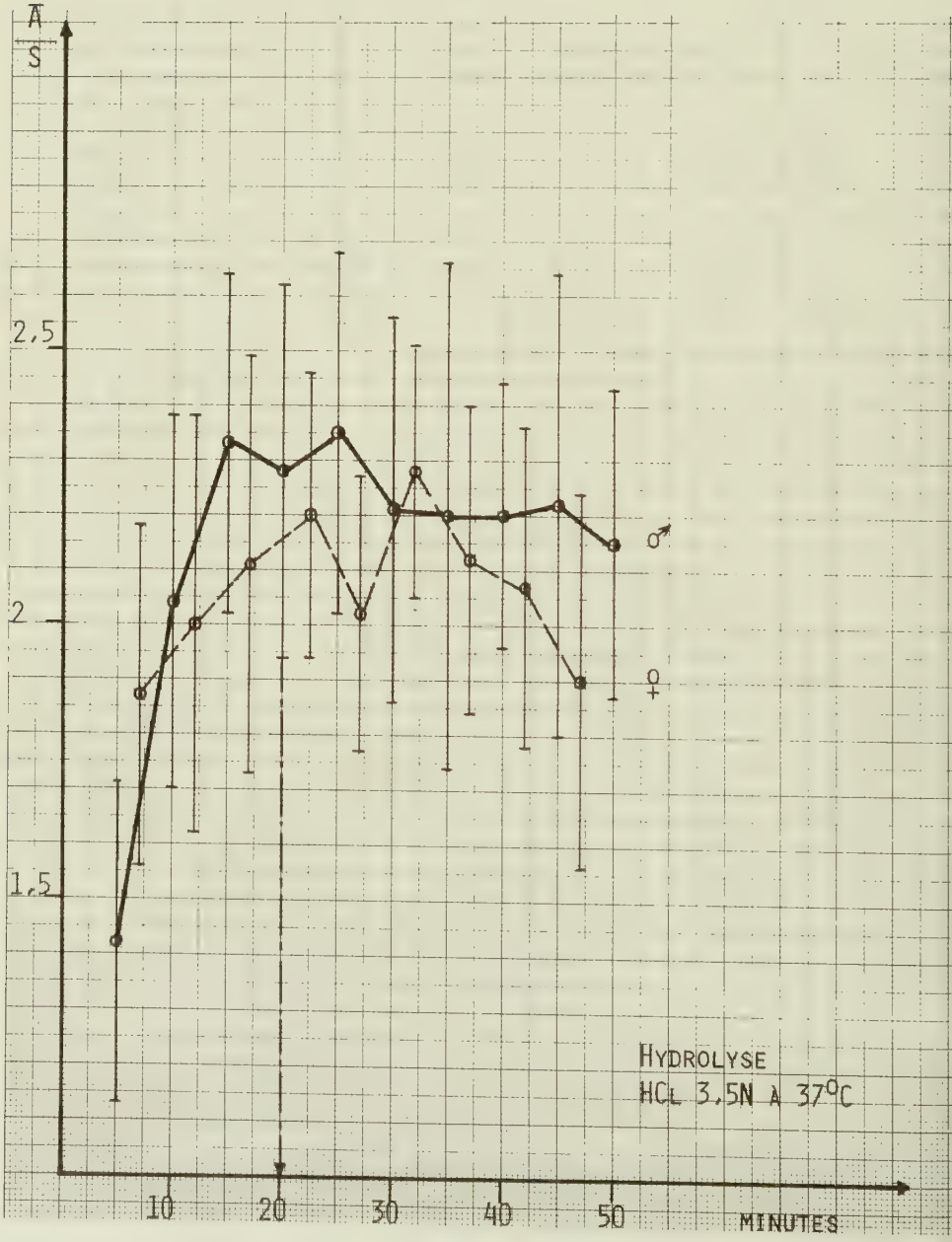


Figure I. 12.: Etude de la réaction optimale de Feulgen en fonction du temps d'hydrolyse avec HCl 3,5 N à 37°C.



### 3.3.4. Technique utilisée

a. Préparation des réactifs

Acide chlorhydrique 3,5 N :

| | |
|---|---|
| HCl à 37 % (p.a. Merck) | 290 ml |
| Eau distillée | ad 1000 ml |

Réactif de Schiff :

| | |
|---|---|
| Eau distillée | 990 ml |
| HCl à 37 % (p.a. Merck) | 40 ml |
| Métabisulfite de Na (p.a. Merck) | 25 g |
| Pararosaniline base (Merck) | 10 g |

Cette solution, après agitation, est placée 12 heures à l'obscurité. On ajoute alors 5 g de charbon actif et l'on agite 2-3 minutes.
Après filtration, le réactif qui doit être incolore, est conservé au réfrigérateur à l'abri de la lumière. Dans ces conditions, il garde ses propriétés six mois au moins (34).

Solution sulfureuse :

| | |
|---|---|
| Métabisulfite de Na 10 % | 90 ml |
| HCl 1N | 45 ml |
| Eau distillée | ad 900 ml |

Cette solution doit se préparer extemporanément.

b. Mode opératoire

- Remplir un bac pour histologie avec 250 ml d'HCl 3,5 N et le mettre à tempérer à 37°C dans un bain-marie thermostatisé.
- Remplir un autre bac avec le réactif de Schiff et le déposer à température ambiante dans l'obscurité.
- Amener les coupes à colorer à l'eau suivant la technique décrite sous 3.3.3.

- Placer le panier contenant les coupes dans de l'eau distillée à 37°C pendant 10 minutes.
- Le transvaser dans le bac contenant l'HCl 3,5 N pour une hydrolyse de 20 minutes.
- Arrêter l'hydrolyse par rinçage à l'eau distillée pendant 10 minutes en changeant l'eau plusieurs fois.
- Colorer deux heures au réactif de Schiff.
- 10 minutes avant la fin de la coloration, préparer trois bains d'eau sulfureuse.
- Blanchir les coupes par un passage de 10',5' et 2' respectivement dans chaque bain.
- Rincer 14 minutes à l'eau courante
- Déshydrater et monter à l'Eukitt. (Figure I.20.)

## 3.4. Méthode pour le dosage des histones

### 3.4.1. Introduction

Ces protéines basiques, découvertes en 1884 par Kossel, sont les constituants essentiels des chromosomes de tous les eucariotes. Les connaissances actuelles tendent à démontrer que les histones jouent un rôle prépondérant dans la protection du DNA contre les altérations physiques et dans la régulation de l'expression génétique (99).

Leur nature et leur structure sont partiellement élucidées de nos jours, mais nous ignorons encore les mécanismes moléculaires précis des interactions entre les histones et le DNA (110).

De nombreux chercheurs ont fait des études histochimiques de ces protéines (11)(26)(35)(40)(50)(119)(120), et ont montré que le rapport acide nucléiques/histones était constant pour un type de cellules donné.

### 3.4.2. Choix d'une méthode

La méthode histochimique la plus couramment utilisée est la technique au Fast Green à pH alcalin d'Alfert et Geschwind ( 1 ). Cette coloration a été vivement critiquée par de nombreux auteurs ( 77 )( 51 ) ( 91 ) qui lui reprochent son manque de reproductibilité. D'autre part, il est bien connu que cette réaction ne colore pas les nucléoles, or Muramatsu et Busch ( 76 ) ainsi que Prestayko et Busch ( 92 ) montrèrent par des méthodes biochimiques que les nucléoles contenaient en réalité des histones.

Après un essai peu fructueux avec cette technique (coupes colorées irrégulièrement, parfois absence de coloration des noyaux) nous l'avons définitivement abandonnée au dépend de la technique du Biebrich scarlet en milieu alcalin préconisée et mise au point par Spicer (111)(112). Les interactions de ce colorant avec les histones ont été étudiées par Winkelman et Spicer (126) qui démontrèrent que la coloration orange obtenue à pH 9,5 est spécifique des protéines basiques. Ils remarquèrent que le formol inhibe fortement cette réaction, c'est donc un fixateur à bannir. Le chlorure mercurique, par contre, donne d'excellents résultats.

Nous avons choisi pour cette raison le liquide de Zenker qui convient parfaitement à cette coloration, ainsi qu'à la réaction de Feulgen (voir 3.3.2.)

### 3.4.3. Etude stoechiométrique

#### a. Dépôt direct d'histones sur lames

Nous avons construit un modèle artificiel nous permettant de vérifier dans quelle mesure cette réaction métachromatique est proportionnelle à la quantité d'histones contenues dans l'objet à mesurer.

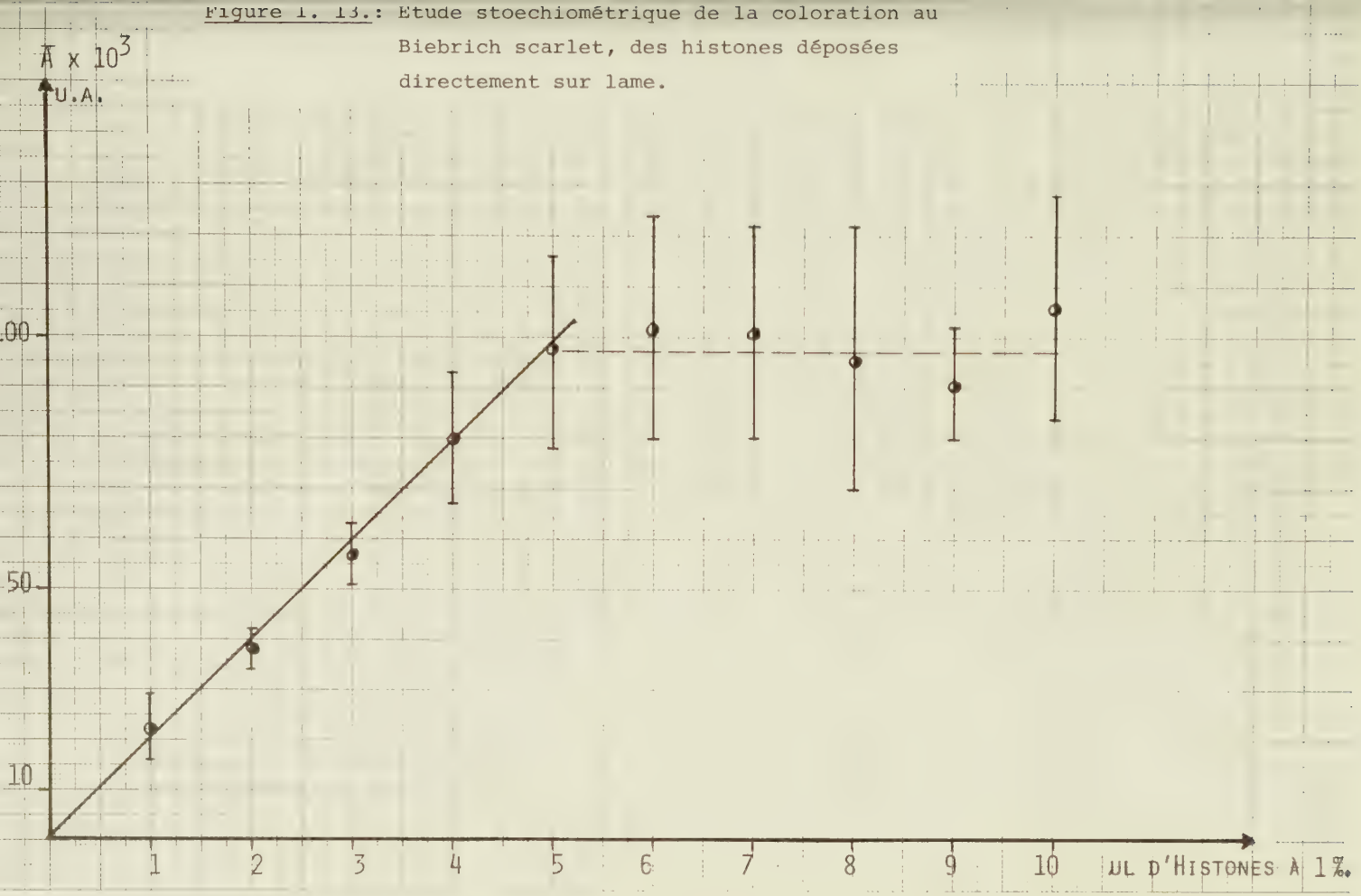
Des histones (calf thymus,Calbiochem) ont été mises en solution dans du NaCl physiologique à la concentration de 1 ‰ . Cette solution a été déposée sur des lames à raison de 1,2,3,4,5,6,7,8,9 et 10 µl à l'aide d'une seringue Hamilton. Ces gouttes sont séchées une heure à 60°C, puis nous collodionnons les lames pour éviter une perte des protéines lors de l'immersion dans le colorant. La coloration est exécutée selon la méthode décrite sous 3.4.4. et les surfaces totales de chaque goutte sont dosées au Vickers.

Les résultats donnés dans la figure I.13. montrent que nous avons une bonne linéarité pour les doses allant de 0 à 5 µl . Au dessus de cette concentration, le phénomène de saturation nette que nous constatons montre certainement que nous dépassons les capacités de notre appareil de mesure.

Tableau I. 9.: Etude stoechiométrique de la coloration au Biebrich scarlet, des histones déposées directement sur lame

| µL D'HISTONES À 1‰ | $\bar{A}$ PAR GOUTTE $\times 10^3$ u.a. | ECART TYPE $s \times 10^3$ |
|---|---|---|
| 1 | 22,5 | 6,4 |
| 2 | 37,5 | 4,2 |
| 3 | 57,3 | 5,9 |
| 4 | 80,1 | 13,2 |
| 5 | 97,7 | 19,5 |
| 6 | 102,6 | 22,1 |
| 7 | 100,6 | 20,7 |
| 8 | 95,6 | 25,9 |
| 9 | 92,0 | 11,2 |
| 10 | 105,7 | 22,0 |

Figure 1. 13.: Etude stoechiométrique de la coloration au Biebrich scarlet, des histones déposées directement sur lame.



La droite de régression a été calculée pour les points 1 à 5 µl (tableau I. 9.). Nous obtenons pour la droite $y = mx + b$

$m = 19,3 \cdot 10^3$

$b = 1,12 \cdot 10^3$

$r = 0,998$ = coefficient de corrélation

En conclusion, cette portion de courbe est bien assimilable à une droite.

b. Histones fixées au Zenker et emparaffinées

Dans cette deuxième partie, nous avons étudié l'effet de la fixation au liquide de Zenker et de l'emparaffinage sur notre réaction colorée. Nous avons construit dans ce but un nouveau modèle artificiel de la façon suivante:

- Nos histones (calf thymus, Calbiochem) sont diluées dans du NaCl physiologique à diverses concentrations et chauffées à 37°C.
- Nous préparons de l'agar-agar (Merck) à 2 % dans du NaCl physiologique, et le maintenons liquide à 37°C.
- Un volume de cet agar-agar bien déterminé est ajouté à nos diverses concentrations d'histones de telle façon que les concentrations finales de ces protéines soient de 1 %,0,6 % ,0,5 % ,0,4 % ,0,3 % ,0,2 % ,et 0,1 % respectivement et que l'agar-agar soit à 0,5 %
- Nous aspirons un volume de 1 ml de chaque concentration avec des seringues de plastic de 1 ml dont on a coupé l'embout.
- Le liquide est refroidi et nous obtenons des cylindres d'agar de diamètre identique en poussant simplement le piston.
- Ces cylindres sont sectionnés en tronçons de 2 cm environ et fixés au liquide de Zenker pendant 8 heures.

- Ils suivent ensuite le processus normal de déshydratation, puis sont inclus dans une paraffine dont le point de fusion est inférieur à 60°C, pour ne pas reliquéfier le gel.
- Les tronçons d'agar sont placés verticalement dans la paraffine, coupés à 7 µ , montés sur lame, déparaffinés, collodionnés, colorés suivant la technique décrite sous 3.4.4. et la surface totale de chaque coupe est dosée au Vickers dans les conditions optimales(3.4.4.).

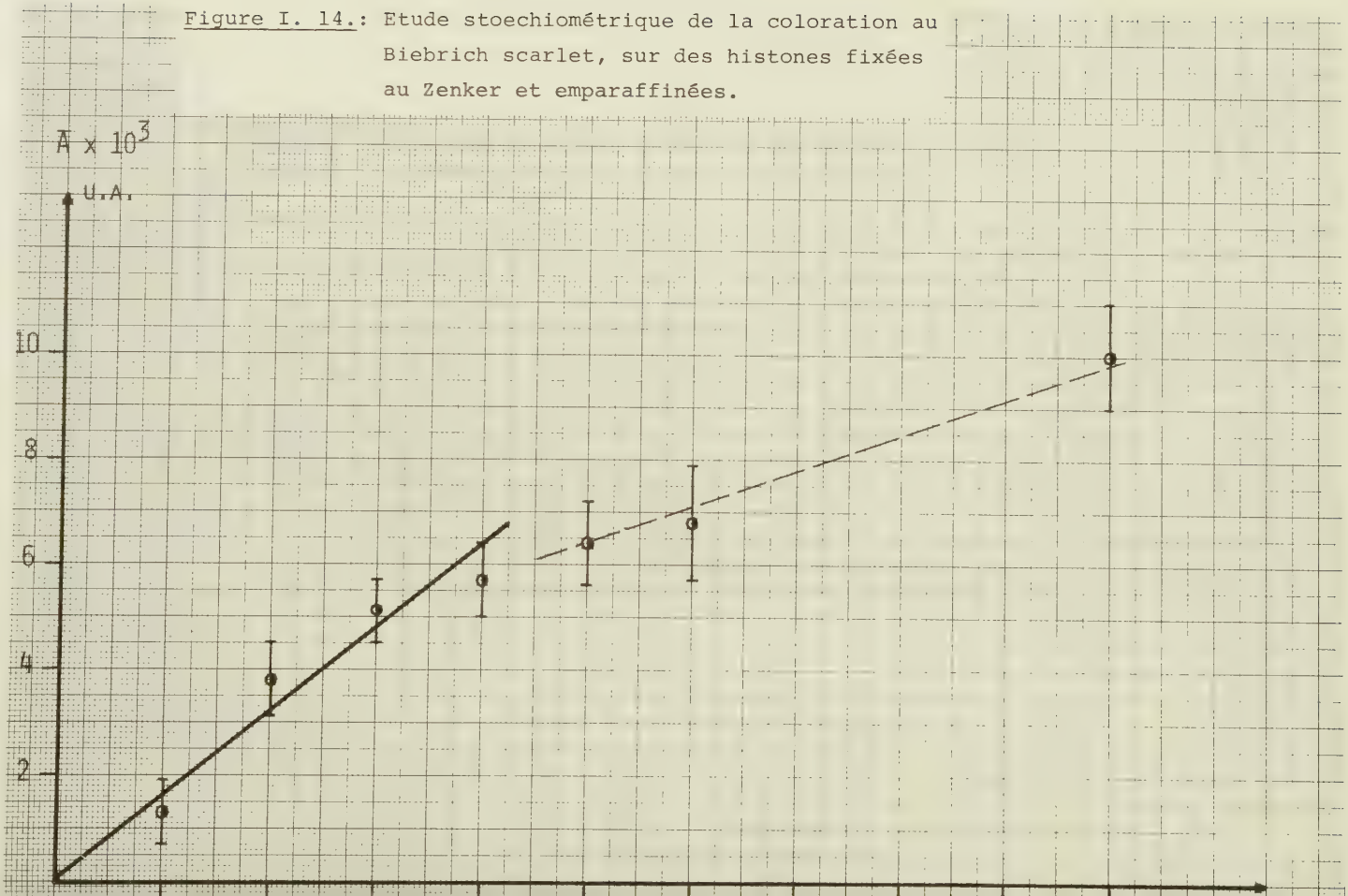
Nous constatons (fig. I.14. et tableau I.10.) que nous obtenons une droite pour les doses d'histones allant de 0,1 à 0,4 % (coefficient de corrélation =0,958). A partir de 0,4 % nous perdons une certaine quantité d'histones, certainement par diffusion lors de la déshydratation des tronçons d'agar.

Nous pouvons conclure que le Zenker est un fixateur correct des histones et qu'il permet la réaction métachromatique du Biebrich scarlet.

Tableau I. 10.: Etude stoechiométrique de la coloration du Biebrich scarlet sur des histones fixées au Zenker et emparaffinées.

| % D'HISTONES | $\bar{A}$ Totale pour une coupe de volume donné. x $10^3$ u.a. | ECART TYPE x $10^3$ |
|---|---|---|
| 0,1 | 1,31 | 0,62 |
| 0,2 | 3,77 | 0,65 |
| 0,3 | 5,14 | 0,61 |
| 0,4 | 5,68 | 0,71 |
| 0,5 | 6,36 | 0,79 |
| 0,6 | 6,78 | 1,05 |
| 1,0 | 10,03 | 1,00 |

Figure I. 14.: Etude stoechiométrique de la coloration au Biebrich scarlet, sur des histones fixées au Zenker et emparaffinées.



3.4.4. Méthode utilisée pour la coloration et le dosage des histones (112).

a. Méthode histochimique

Les organes à étudier, fixés au Zenker pendant 8 heures, emparaffinés sont coupés à 7 µ . Ces coupes sont déparaffinées et débarassées de leurs précipités mercuriels, (voir 3.3.3.). Nous préparons alors la solution suivante à pH 9,5 :

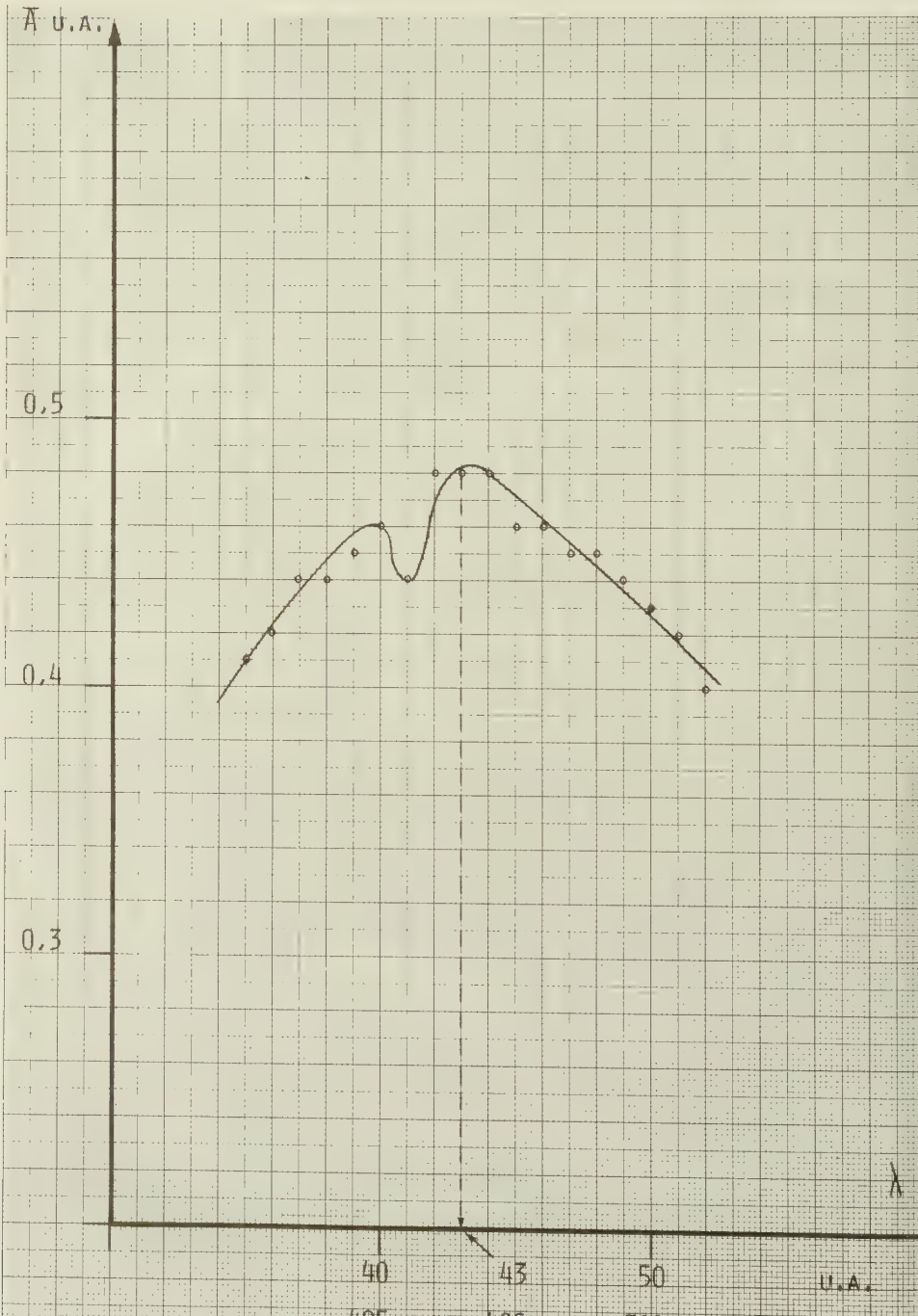
| | | |
|---|---|---|
| NaOH (Merck) | 7 | ml |
| Glycocolle (p.a.Merck) | 20 | ml |
| Eau distillée | 13 | ml |
| Biebrich scarlet (Chroma) | 16 | mg |

Le colorant est dissout à l'agitateur magnétique et le pH est ajusté au besoin à 9,5 avec quelques gouttes de NaOH 1N.
Les coupes sont plongées 60 minutes dans ce réactif puis déshydratées rapidement dans l'alcool 95° et absolu sans rinçage intermédiaire.
Le montage se fait à l'Eukitt (O.Kindler).(Figure I.20.)

b. Dosage au Vickers

Nous nous plaçons dans des conditions de réglage identiques à celles que nous avons utilisées pour la coloration de Feulgen (3.3.3.). Seule la longueur d'onde varie, elle devient 496 nm (43 u.a.) en fonction du spectre d'absorption de la coloration métachromatique de notre réactif (fig. I. 15.).

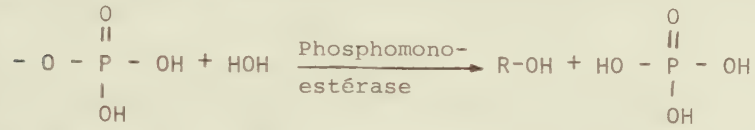
Figure I. 15.: Spectre d'absorption de la coloration de Biebrich scarlet, exécuté sur le VICKERS.



## 3.5. Estimation de l'activité des phosphomonoestérases non spécifiques

### 3.5.1. Introduction

Ce groupe d'enzymes responsables de la scission des esters monophosphates suivant la réaction:




est en réalité formé de deux types d'enzymes qui réagissent à des pH bien définis: la phosphatase acide* à pH 5 et la phosphatase alcaline* à pH 9 environ.

a. Phosphatase alcaline

La méthode de Gomori ( 43 ) est l'une des plus utilisée actuellement encore, pour la mise en évidence de cette enzyme. Cette technique ne permet cependant des dosages quantitatifs que si l'on fait des analyses comparatives longues et laborieuses. D'autre part, elle a le désavantage de donner fréquemment des fausses localisations et des artefacts.

L'utilisation des naphtolphosphates substitués comme substrat de cette réaction a ouvert récemment une voie nouvelle à l'étude des phosphatases non spécifiques. La coloration est alors réalisée par un couplage du naphtol substitué avec un sel de diazonium ou avec une pararosaniline hexazotisée (Stutte(115)). Cette dernière technique présente l'avantage de donner un produit final coloré en rouge, essentiellement non particulaire et dont la localisation est excellente.
C'est la méthode que nous utiliserons, car elle convient parfaitement à un dosage quantitatif avec notre appareil.

(* sous cette dénomination générale, nous sous-entendons que nous avons deux familles de phosphomonoestérases différentes qui ont le même mode d'action non spécifique.)

b. Phosphatase acide

Cette enzyme ne fut étudiée sur le plan histochimique que beaucoup plus tard que son homologue alcalin Nous avons choisi pour l'analyser une méthode parallèle à celle de Stutte pour la phosphatase alcaline: la méthode de Barka et Anderson ( 6 ) qui utilise également un naphtol-phosphate substitué comme substrat couplé à la pararosaniline hexazotisée.

3.5.2. Etude de la cinétique enzymatique

Afin de déterminer le temps d'incubation à choisir pour chacune de nos activités enzymatiques au niveau de la peau de la souris, nous avons sacrifié un animal normal de trois mois, auquel nous avons prélevé la peau rasée et le foie. Ces organes ont été congelés selon la méthode décrite sous 2.2.6. . Ils sont alors coupés à 7 µ au cryostat (Bright), montés sur lamelle, séchés et colorés suivant les techniques 3.5.3. et 3.5.4. . Une coupe est sortie du bain d'incubation toutes les deux minutes et la réaction est arrêtée immédiatement par lavage au NaCl physiologique glacé. Nous mesurons au Vickers l'activité enzymatique (3.5.5.) d'une même zone de chaque coupe (follicule pileux pour la phosphatase acide et capillaires sanguins dermiques pour la phosphatase alcaline). Le tableau I. 11. et les figures I. 16. et I. 17.,qui reportent les absorbances moyennes par unité de surface mesurée en fonction du temps d'incubation, montrent qu'un temps de 10 minutes convient pour chacune des réactions .

Tableau I. 11. : Etude de la cinétique enzymatique de la phosphatase acide et alcaline. $\bar{A}$ = absorbance moyenne par unité de surface (masque de 15 µ de diamètre) estimée sur 10 mesures effectuées au niveau du follicule pileux pour la phosphatase acide et des capillaires sanguins dermiques pour la phosphatase alcaline.

| PHOSPHATASE ACIDE | | | PHOSPHATASE ALCALINE | | |
|---|---|---|---|---|---|
| TEMPS | $\bar{A}$ | S | TEMPS | $\bar{A}$ | S |
| 2′ | 2,17 | 0,62 | | | |
| 4′ | 3,44 | 0,54 | 4′ | 2,41 | 0,71 |
| 6′ | 4,14 | 0,71 | 6′ | 3,80 | 0,79 |
| 8′ | 5,10 | 1,02 | 8′ | 4,08 | 1,01 |
| 10′ | 6,39 | 1,28 | 10′ | 4,56 | 1,19 |
| 12′ | 7,36 | 0,52 | 12′ | 6,44 | 0,66 |
| 14′ | 8,92 | 1,15 | 14′ | 6,75 | 0,57 |
| 16′ | 8,55 | 1,02 | 16′ | 9,01 | 0,48 |
| 18′ | 8,54 | 0,97 | 18′ | 8,85 | 0,61 |
| 20′ | 9,09 | 0,84 | 20′ | 8,08 | 1,36 |
| | | | 22′ | 8,26 | 1,15 |
| | | | 24′ | 9,76 | 0,92 |
| | | | 26′ | 9,08 | 1,04 |

Figure I. 16.: Etude de la cinétique enzymatique de la phosphatase acide

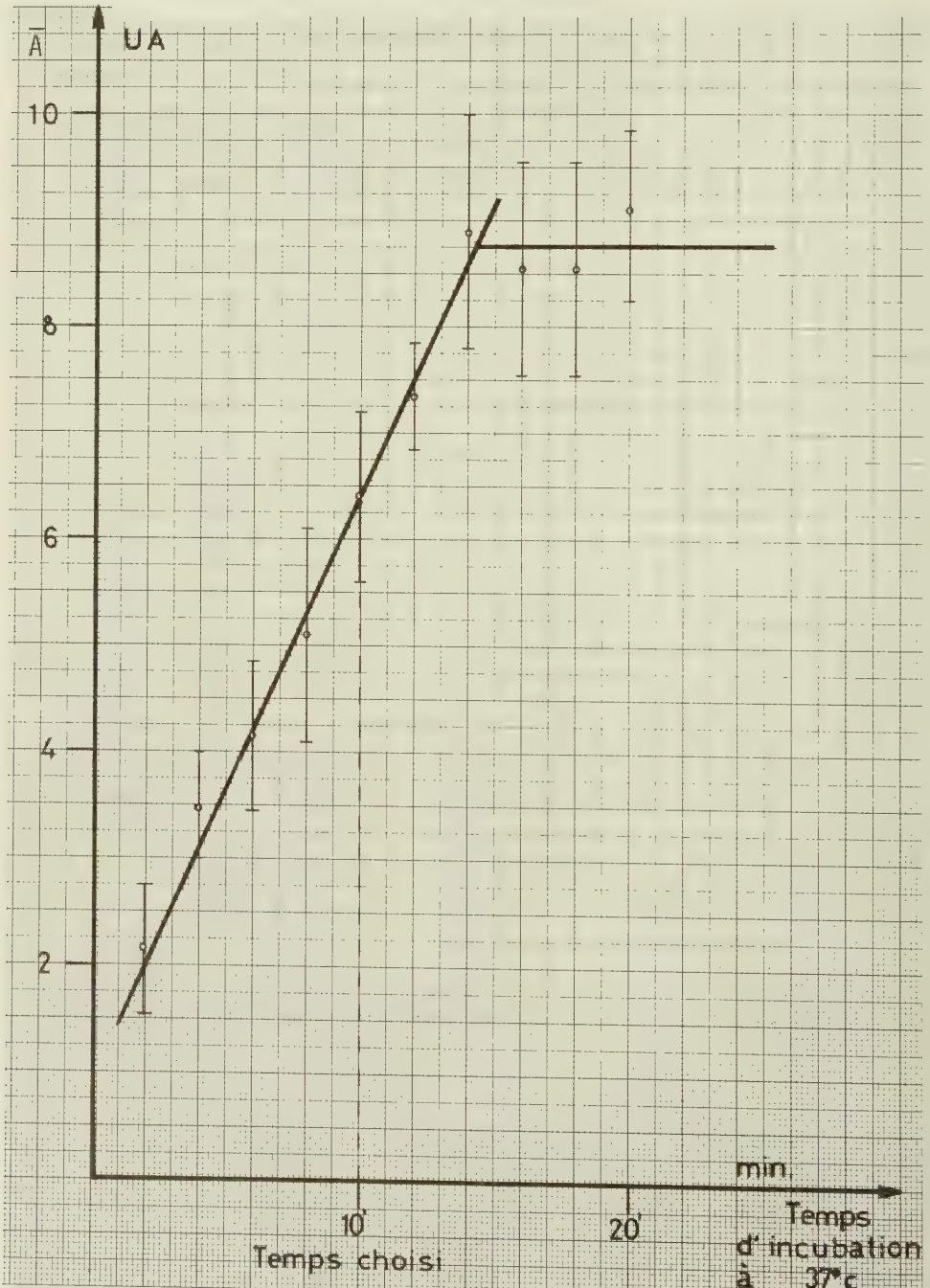
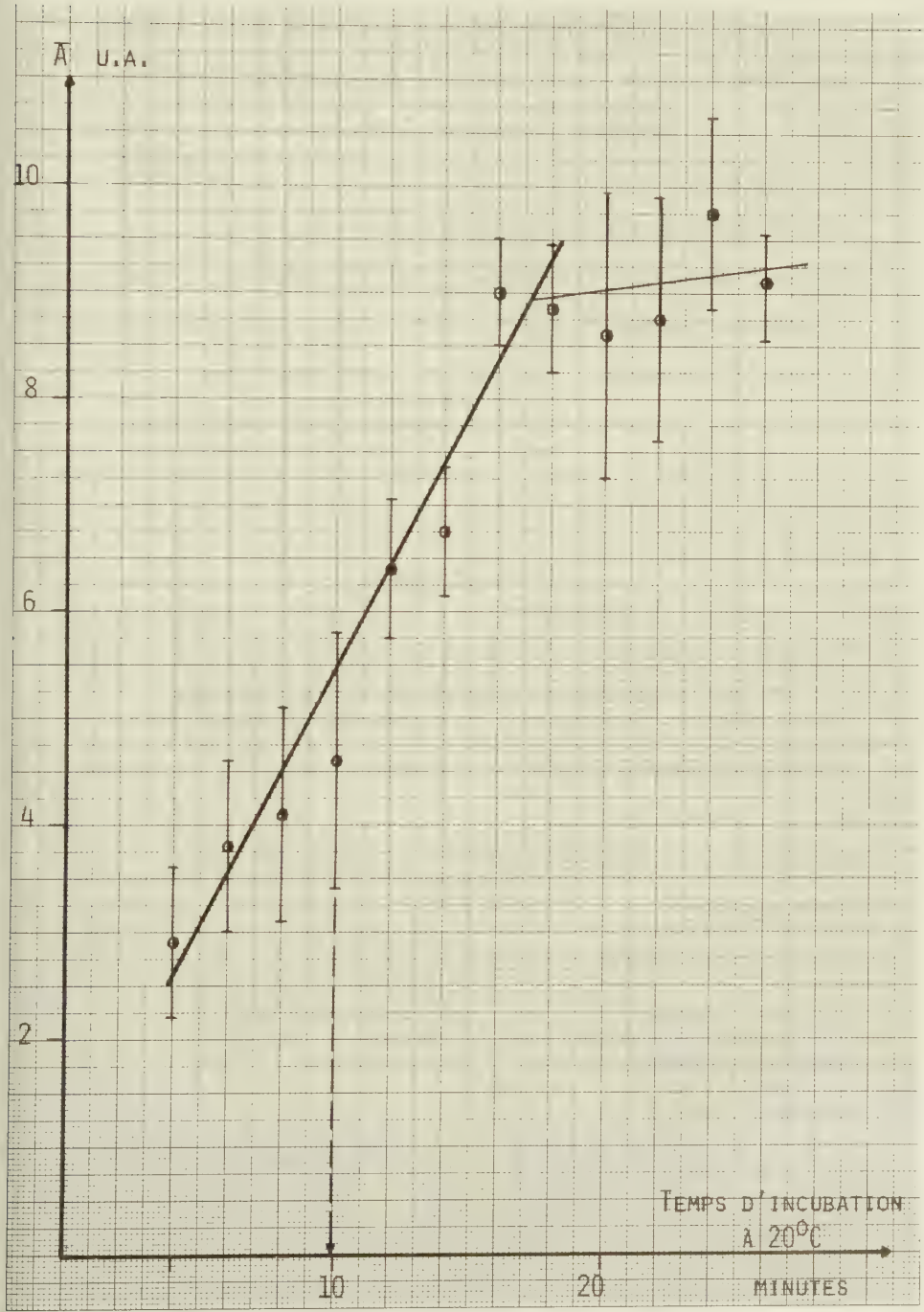


Figure I. 17.: Etude de la cinétique enzymatique de la phosphatase alcaline



3.5.3. Technique pour la phosphatase acide (Barka et Anderson ( 6 )).

a. Réactifs

Tampon véronal suivant Michaëlis à pH 5.

Solution A :

| | | |
|---|---|---|
| Acétate de Na anhydre (p.a. Merck) | | 11,72 g |
| Barbital sodique (p.a. Merck) | | 29,43 g |
| Ajuster avec eau distillée | ad | 1000 ml |

Solution B :

HCl 0,1 N

Solution C :

| | | |
|---|---|---|
| NaCl (p.a. Merck) | | 8,5 g |
| Eau distillée | ad | 100 ml |

Mélanger : 10 ml de A + 17,6 ml de B + 4 ml de C et ajuster à 50 ml. Cette solution est préparée chaque semaine.

Pararosaniline hexazotisée

a. pararosaniline-HCl :

| | |
|---|---|
| pararosaniline (Merck) | 0,2 g |
| Eau distillée | 4 ml |
| HCl 37% (p.a. Merck) | 1 ml |

b. Nitrite de Na :

| | |
|---|---|
| $NaNO_2$ (p.a. Merck) | 0,2 g |
| Eau distillée | 5 ml |

Mélanger extemporanément x ml de a + x ml de b.

α-naphtol AS-BI phosphate

| | |
|---|---|
| α-naphtol AS-BI phosphate (pur A.R. Koch-Light) | 50 mg |
| N,N-diméthylformamide (p.a. Merck) | 5 ml |

b. Méthode

Les fragments de peau préparés et congelés suivant la technique décrite sous 2.2.6. sont coupés transversalement au cryostat (Bright) à une épaisseur de 7 µ . Ces coupes sont montées sur lamelles et fixées 20 minutes dans de l'acétone à -30°C, pour éviter une diffusion des enzymes à étudier. Elles sont ensuite plongées dans le milieu d'incubation suivant:

| | |
|---|---|
| Tampon véronal suivant Michaëlis à pH5 | 6,25 ml |
| Eau distillée | 15 ml |
| Pararosaniline hexazotisée | 2 ml |
| α-naphtol AS-BI phosphate | 1,25 ml |

Ajuster le pH avec du NaOH 1N

Filtrer

Incuber 10 minutes à 37°C au bain-marie. Arrêter la réaction par lavages rapides au NaCl physiologique glacé. Monter au glycérogel et conserver les lames au réfrigérateur (Figure I. 20.).

3.5.4. Technique pour la phosphatase alcaline (Stutte (115))

a. Réactifs

Tampon Tris pH 8,4

| | | |
|---|---|---|
| Tris (p.a. Merck) 0,2 M (24,23 g/l) | | 25 ml |
| HCl 0,1 N | | 17,3ml |
| Ajuster avec de l'eau distillée | ad | 100 ml |

Les autres réactifs sont les mêmes que ceux de la phosphatase acide

b. Méthode

Les fragments de peau coupés au cryostat à 7 µ et montés sur lamelles sont incubés dans le milieu suivant à pH 8,4 :

| | |
|---|---|
| Tampon Tris pH 8,4 | 20 ml |
| Pararosaniline héxazotisée | 0,1 ml |
| α-naphtol AS-BI phosphate | 0,5 ml |

Ajuster le pH à 8,4 avec NaOH 1N
Filtrer

Incuber les coupes 10 minutes dans ce milieu à 20°C. Arrêter la réaction avec du NaCl physiologique glacé et monter au glycérogel. Conserver les coupes au réfrigérateur (Figure I.20.).

3.5.5. Dosage de l'activité enzymatique au Vickers

Ces deux enzymes seront étudiées au niveau du derme et du follicule pileux, car ce sont les zones de la peau présentant la plus forte activité (55 )(90 )(113)(74). Nous mesurons à l'aide de notre appareil la coloration obtenue avec un masque de surface fixe. Nous répétons chaque mesure 10 fois en choisissant au hasard les zones du derme situées directement sous l'épiderme et au niveau du follicule pileux (Figure I.20.).

Nous calculerons alors l'absorbance moyenne par unité de surface, ce qui permet d'estimer ainsi l'activité enzymatique moyenne:

$$\frac{\text{Absorbance moyenne}}{\text{Surface colorée moyenne}} = \frac{\bar{A}}{S}$$

Les conditions de mesures au Vickers sont les suivantes:

- Longueur d'onde 518 nm (49 u.a.) (Fig. I.18.et I.19.)
- Spot $N^{O}$ 3
- Largeur de bande 60 u.a.
- Masque 50 µ de diamètre
- Objectif 20 x
- Oculaire 10 x

Figure I. 18.: Spectre d'absorption de la coloration de la phosphatase acide exécuté au VICKERS

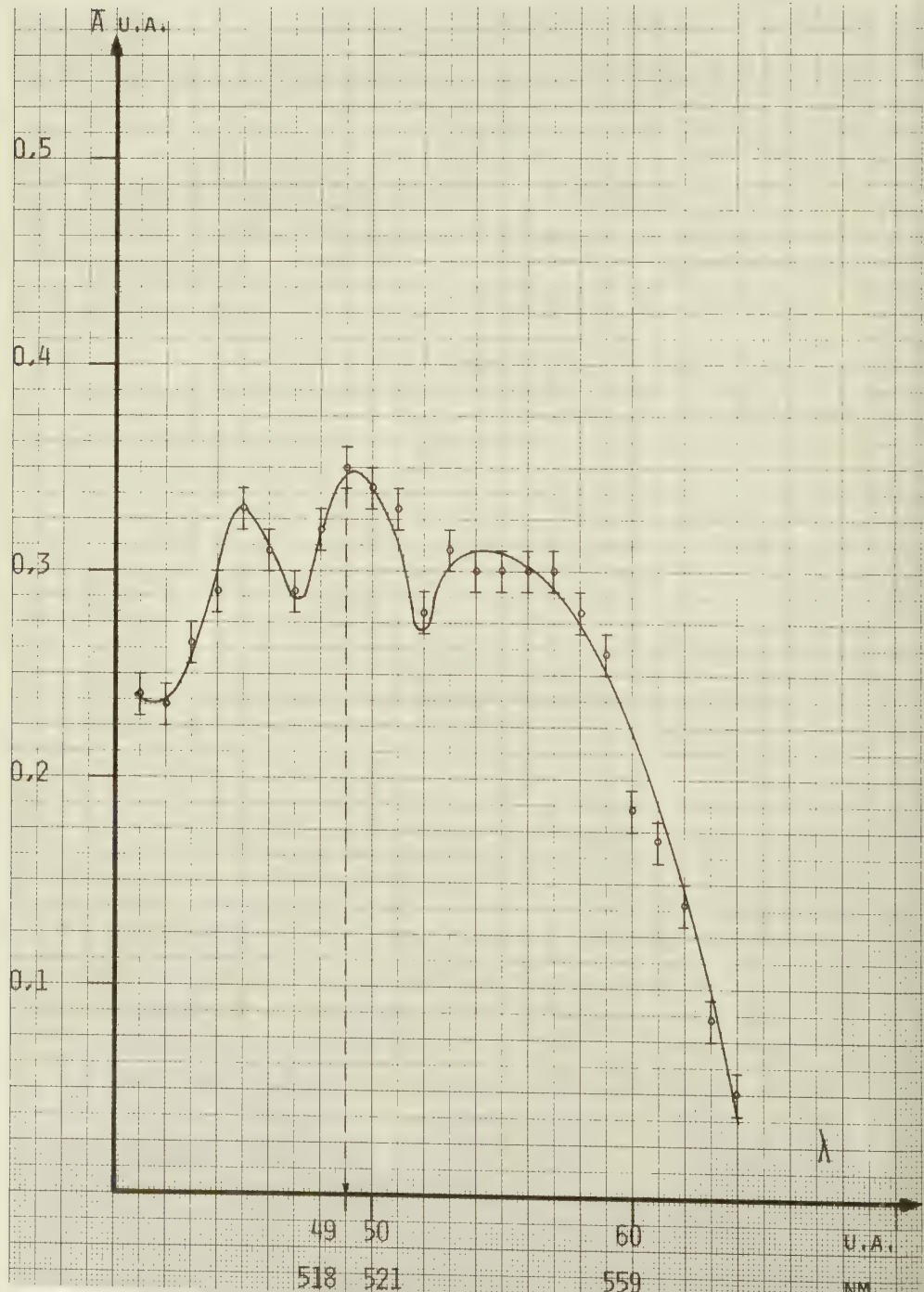


Figure I. 19.: Spectre d'absorption de la coloration de la phosphatase alcaline exécuté au VICKERS

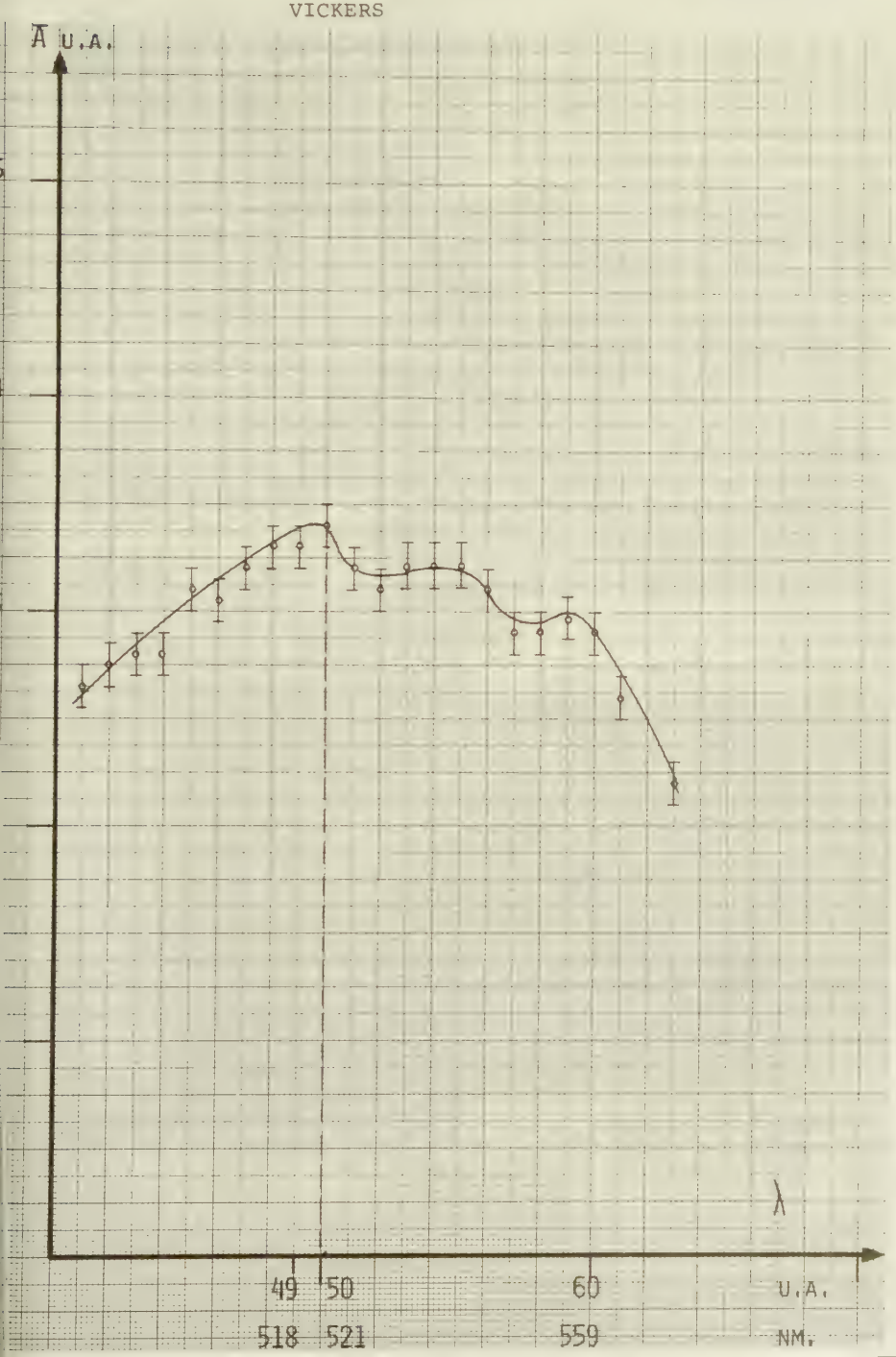
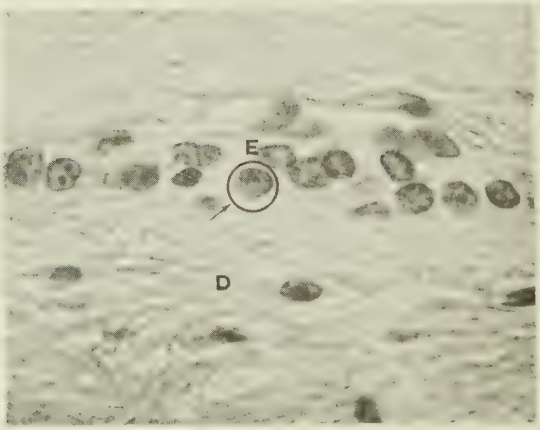


Figure I.20. : Aspect microscopique des diverses colorations histochimiques.
**E** = épiderme . **D** = derme . **H** = hypoderme .
**F** = follicule pileux
surface mesurée au microdensitomètre



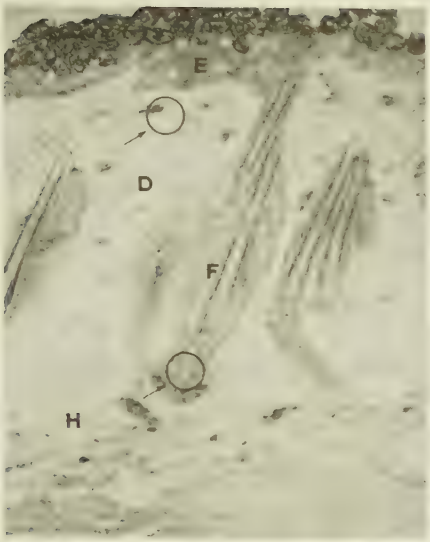

A

A. Peau normale. Coloration du DNA par le Feulgen. (625 X)

B. Peau hyperplasique. Coloration des histones par le Biebrich scarlet. (625 X)

B

Figure 1.20 : suite




C

C. Activité phosphatasique acide colorée suivant la technique de Barka et Anderson dans une peau normale : faible activité dans le derme et forte activité au niveau du follicule pileux (125 X) .

D. Activité phosphatasique alcaline (technique de Stutte) dans une peau normale : activité au niveau des capillaires sanguins (125 X).

E. Activité phosphatasique alcaline à la base des follicules pileux normaux dans le tissu conjonctif entourant le follicule (500 X).

D

E

*les clichés couleurs peuvent être demandés à l'auteur.

# CHAPITRE II - OBSERVATIONS MACRO ET MICROSCOPIQUES AU COURS DES DIVERS TRAITEMENTS .

## 1. Effets macroscopiques

### 1.1. Santé générale

La surveillance du poids de nos animaux tout au long de l'expérience est le seul contrôle de santé concret que nous puissions faire. Nos souris sont pesées par lot (20 individus au départ) deux fois par semaine avant chaque badigeonnage. Nous calculons alors le poids moyen par souris qui varie d'une pesée à l'autre de $\pm$ 2g, chez des animaux non traités, logés et nourris dans nos conditions standardisées. Les courbes données dans les figures II.1.,II.2.,II.3.,et, II.4. ne présentent pas de fluctuations suffisamment importantes par rapport aux lots non traités (R) pour considérer que la santé générale des souris badigeonnées soit perturbée. Les fluctuations qui apparaissent en fin d'expérience dans la plupart des lots proviennent du fait que le nombre d'individus diminue à mesure que l'on exécute les autopsies. Ainsi le prélevement d'un gros ou d'un petit animal, entraînera une modification importante du poids moyen.

### 1.2. Effet des divers traitements sur la peau

Le rasage, les badigeonnages à l'acétone et à l'huile de croton seule, n'ont aucun effet macroscopique sur la peau de nos souris. Nous assistons à une repousse régulière des poils jusqu'au 10 $^{ème}$ badigeonnage (5 semaines après le rasage); dès lors la zone rasée n'est plus visible.

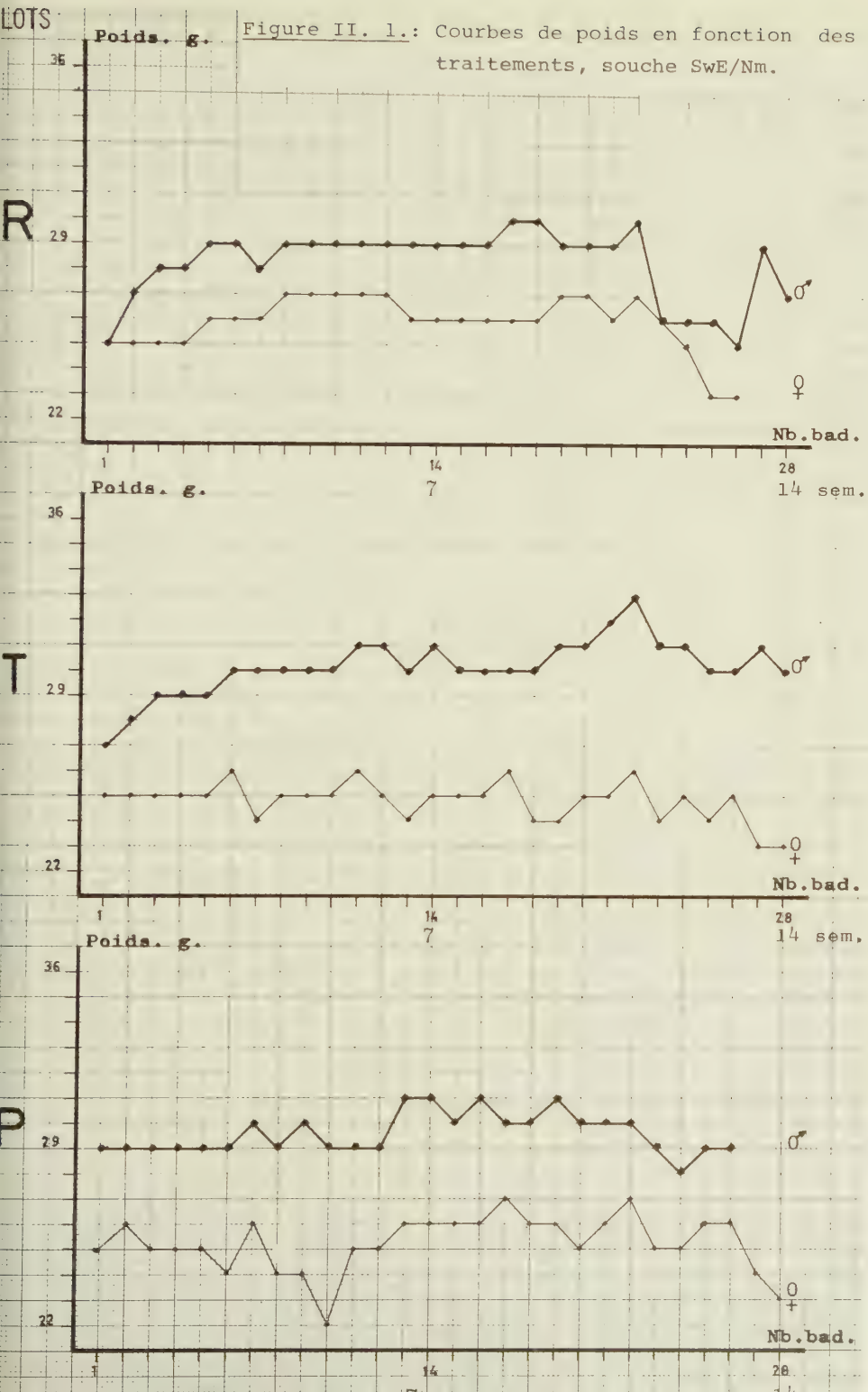



Figure II. 1.: Courbes de poids en fonction des traitements, souche SwE/Nm.

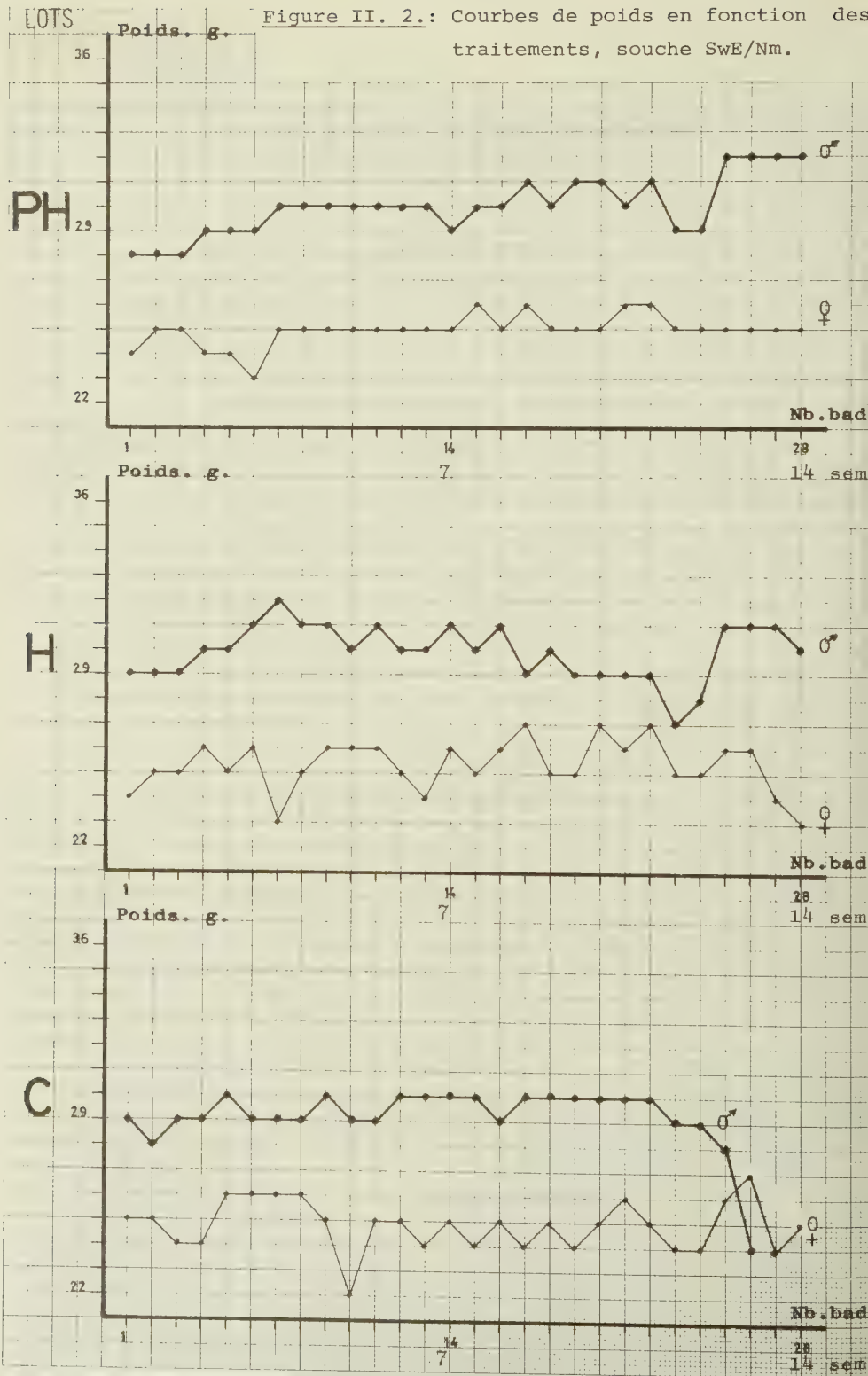



Figure II. 2.: Courbes de poids en fonction des traitements, souche SwE/Nm.

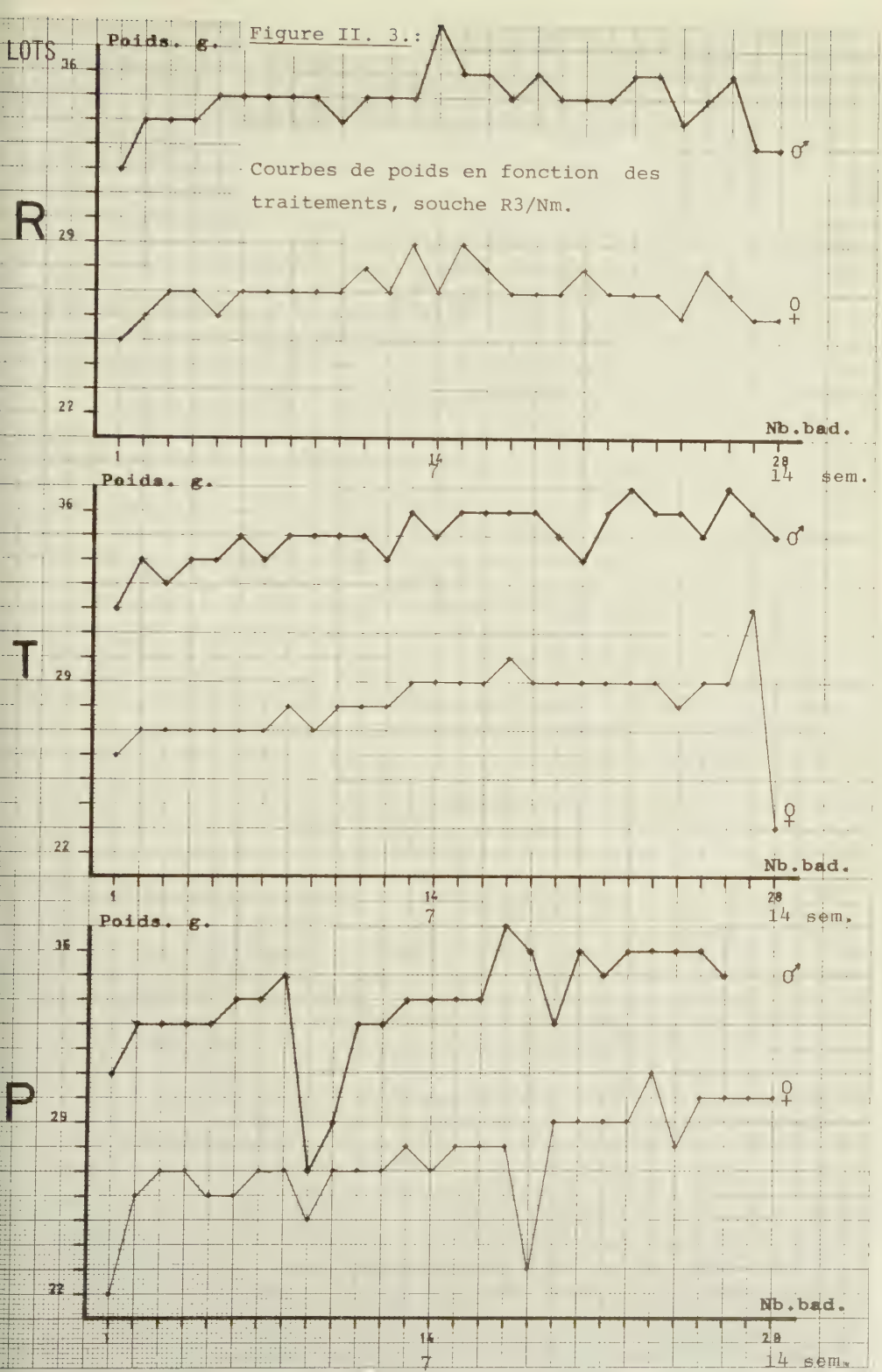
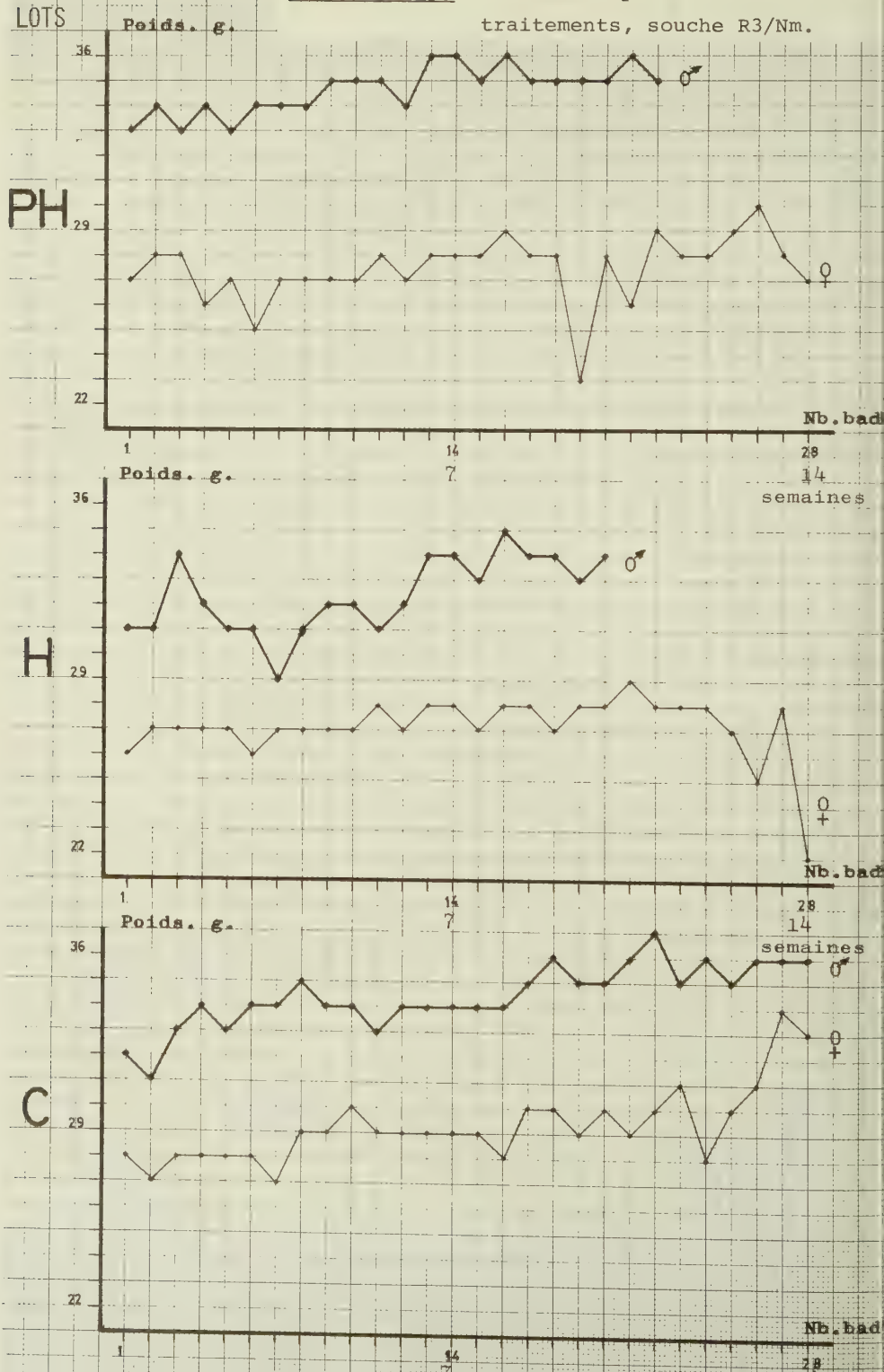



Figure II. 3.:

Courbes de poids en fonction des traitements, souche R3/Nm.

Figure II. 4.: Courbes de poids en fonction d
traitements, souche R3/Nm.



Les fréquences d'apparition des papillomes et des épithéliomas des lots traités au benzo(a)pyrène, au benzo(a)pyrène suivi de l'huile de croton, et, à la 3,4-benzacridine, sont reportés dans la figure II.5. .

Les résultats obtenus sur les mâles et les femelles, qui réagissent de façon parallèle, comme nous l'avons constaté lors de notre premier essai, sont regroupés pour chaque race (Fig. I.5. et I.6.). Le traitement au benzo (a)pyrène entraîne l'apparition des papillomes et des épithéliomas à une fréquence et une latence semblables à celles de l'expérience préliminaire pour les 2 souches. Dans le lot traité au benzopyrène suivi de l'huile de croton, nous observons que seule la souche SwE/Nm réagit et donne une papillomatose qui apparaît au 5$^{è}$ badigeonnage, puis disparaît graduellement; nous n'obtenons que très peu de cancer avec le nombre de badigeonnages effectués. La souche R3/Nm par contre ne réagit pas du tout, ce qui confirme sa moindre sensibilité au benzo(a)pyrène. L'activité de la 3,4-benzacridine est plus faible encore et ne donne que quelques papillomes aux animaux SwE/Nm. Elle semble de visu totalement inactive sur la souche R3/Nm en fonction du temps de traitement.

## 2. Effets microscopiques

### 2.1. Diagnostics histologiques de la peau

Nous avons fixé les conventions suivantes pour poser ces diagnostics: il y a hyperplasie dès que l'épaisseur de l'épiderme dépasse 30$\mu$ . Les épaississements locaux, sans rupture de la couche basale, sont considérés comme des papillomes. Dès que nous sommes en présence de deux ou plusieurs infiltrations de l'épiderme dans le derme et l'hypoderme, nous considérons ces lésions comme des épithéliomas. Les résultats de ces observations sont regroupés dans le tableau II.1.(Fig. II.6.).

Figure II. 5.: Fréquences d'apparitions des papillomes et des épithéliomas en fonction des traitements.

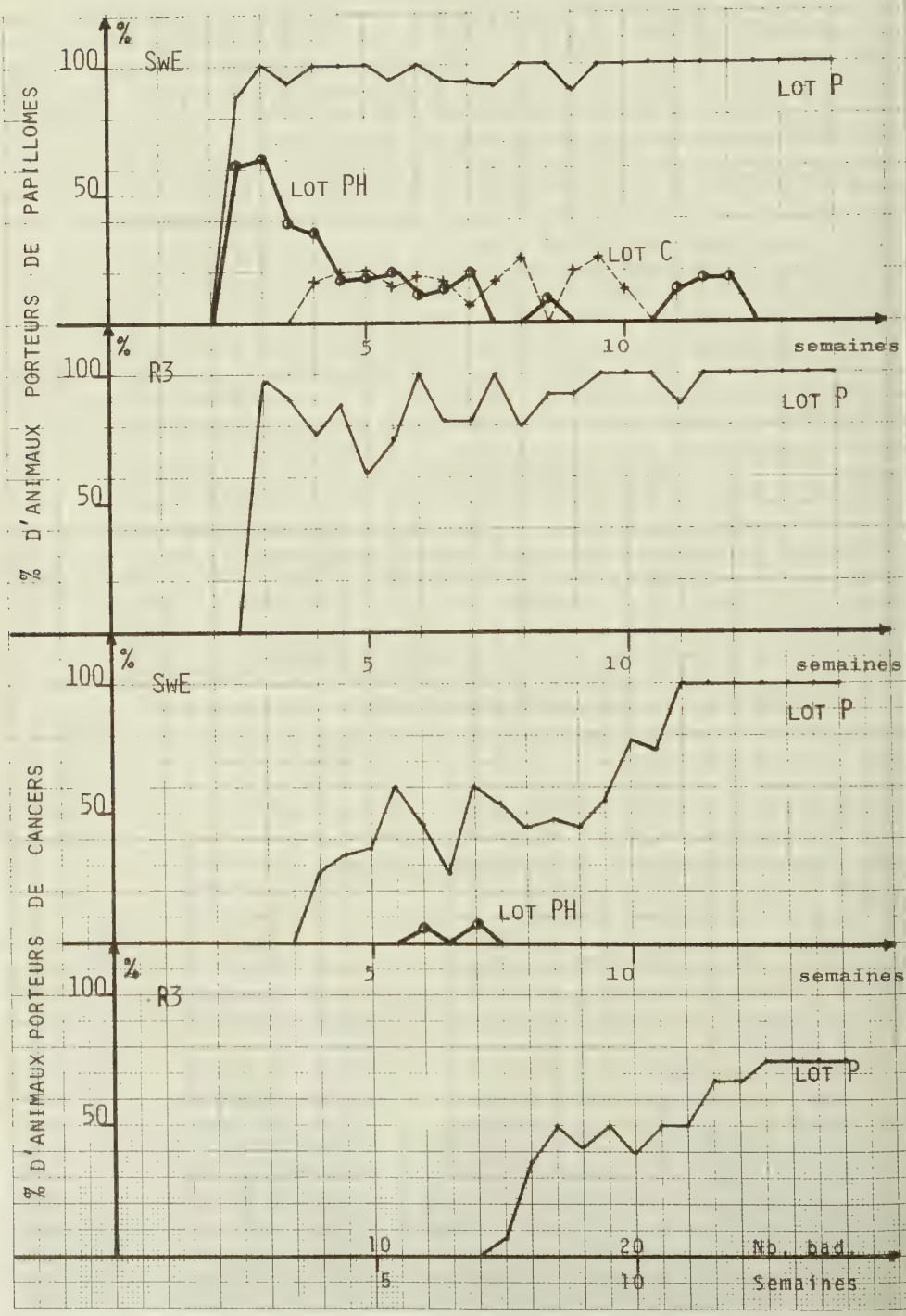


Tableau II. 1.:Diagnostics de l'épiderme des animaux traités. Les animaux des lots R(rasage) et T(acétone) ont tous une peau normale. (H= hyperplasie, P= papillomes, C= épithéliomas)

| NOMBRE DE BADIGEONNAGES | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 14 | 16 | 18 | 20 | 22 | 24 | 26 | 28 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| P BENZO(A) PYRÈNE | SWE ♂ | - | H | H | H | H | P | P | P | P | P | P | - | P | P | P | P | C | C | C | - |
| | SWE ♀ | - | H | H | H | P | P | P | P | P | P | P | P | C | P | P | H | P | P | C | C |
| | R3 ♂ | - | H | H | H | H | P | H | - | - | H | H | H | P | H | H | H | P | P | P | - |
| | R3 ♀ | - | - | H | H | - | H | H | - | - | H | - | - | H | H | H | P | H | P | P | P |
| P H B(A)P + HUILE DE CROTON | SWE ♂ | - | H | H | H | H | P | H | - | H | - | - | - | P | H | P | P | - | P | - | P |
| | SWE ♀ | - | H | H | H | - | - | H | H | - | - | H | - | P | - | - | H | - | H | - | - |
| | R3 ♂ | - | H | - | - | - | - | - | H | - | - | - | P | H | H | H | P | - | P | - | - |
| | R3 ♀ | - | H | H | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | P | - | H | C | - | H | H |
| H HUILE DE CROTON | SWE ♂ | H | H | H | - | - | H | - | - | - | - | H | H | - | - | - | - | - | - | - | H |
| | SWE ♀ | - | H | H | P | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | H | - | - | H | - | - |
| | R3 ♂ | P | - | H | - | H | H | - | - | - | - | - | - | - | H | H | H | - | - | - | - |
| | R3 ♀ | P | - | H | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | P | - |
| C BENZA-CRIDINE | SWE ♂ | - | - | H | H | - | - | H | - | - | - | - | H | H | - | - | - | - | - | - | - |
| | SWE ♀ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | P | - | - | - | - | - | - | - |
| | R3 ♂ | H | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | H |
| | R3 ♀ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

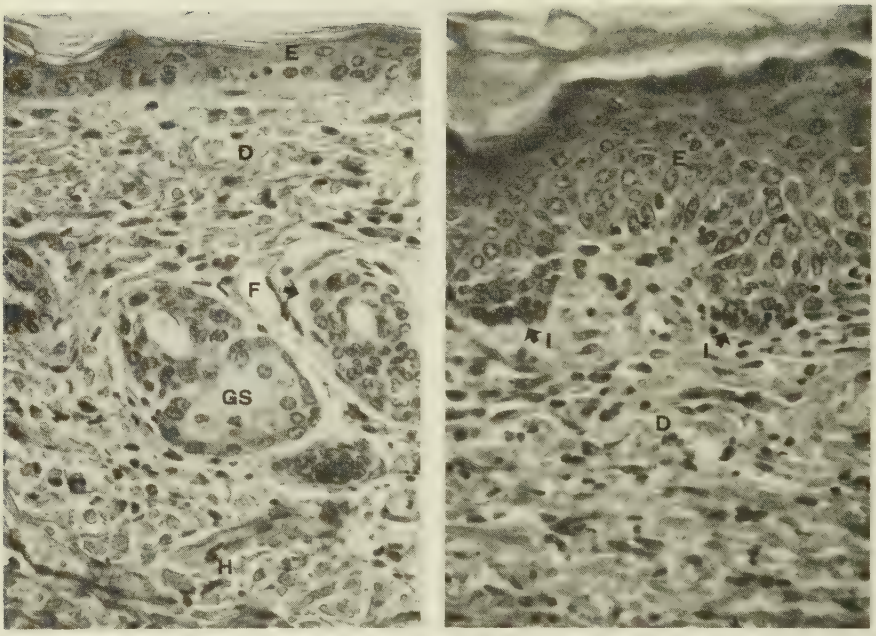
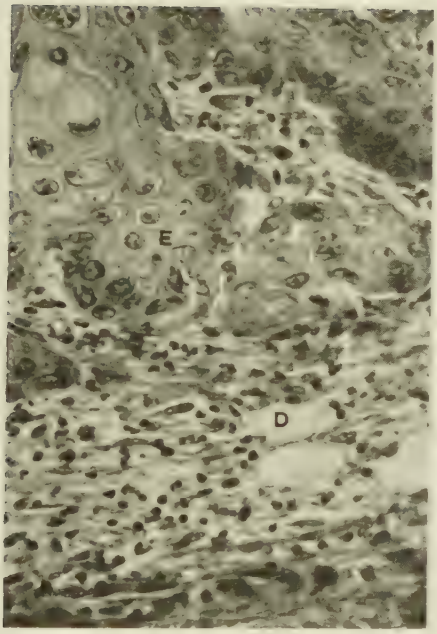



Figure II.6. : Aspect histologique de la peau de la souris normale et traitée au benzo(a)pyrène.

A. Peau normale : **E** = épiderme. **D** = derme. **H**= hypoderme **F** = follicule pileux. **GS**= glande sébacée (250 X).

B. Peau hyperplasique avec un début d'infiltrations (**I**)(250 X)




C

D

Figure II.6. : suite

C. Infiltrations de l'épiderme dans le derme. Présence de cellules épidermiques anormales (250 X).

D. Epithélioma bien déclaré, avec infiltrations de l'épiderme dans le derme et l'hypoderme (125 X).

2.2. Epaisseur de l'épiderme

Cette mesure a été faite à l'aide d'un oculaire micrométrique étalonné. Les valeurs moyennes calculées sur 10 mesures faites tout au long de la coupe sont données dans le tableau II.2.. Comme la stratum corneum se détache facilement de la surface, seules les couches non cornifiées ont été mesurées.

Tableau II. 2.: Estimation de l'épaisseur moyenne de l'épiderme en fonction des divers traitements (écart type)

| LOT | EPAISSEUR MOYENNE DE L'ÉPIDERME EN µ ( Ecart type ) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | SwE ♂ | SwE ♀ | R 3 ♂ | R 3 ♀ |
| R (RASAGE) | 12 (4) | 10 (2) | 13 (6) | 11 (3) |
| T (ACÉTONE) | 14 (8) | 11 (3) | 12 (4) | 10 (2) |
| P (B(A)P) | 80 (90) | 75 (85) | 36 (8) | 39 (14) |
| PH (B(A)P +HUILE DE CROTON) | 30(9) | 28 (9) | 29 (13) | 31 (19) |
| H (HUILE DE CROTON ) | 25 (9) | 24 (8) | 28 (10) | 22 (9) |
| C (BENZACRIDINE) | 22 (13) | 17 (9) | 18 (11) | 13 (5) |

2.3. Estimation de l'index mitotique de l'épiderme

Nous examinons deux groupes de 100 noyaux pris dans 5 zones différentes de la couche basale de l'épiderme de chaque animal.

Les prophases, les métaphases, les anaphases et les télophases sont repérées et regroupées. L'index mitotique est calculé en % des noyaux examinés, en fonction des badigeonnages et des traitements. Seuls les résultats des mâles sont reportés dans le tableau II.3. car les femelles présentent des variations plus importantes de cet index mitotique qui est fonction de leur cycle oestral ( 71 ).

Tableau II. 3. : Estimation de l'index mitotique de la couche basale de l'épiderme des souris mâles.

| Nb de Bad. | INDEX MITOTIQUE % | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | R | | T | | P | | PH | | H | | C | |
| | E | $R^3$ | E | $R^3$ | E | $R^3$ | E | $R^3$ | E | $R^3$ | E | $R^3$ |
| 1 | 4 | 5 | 3 | 2 | 2. | 1 | 1 | 1 | 6 | 10 | 4 | 5 |
| 2 | 6 | 4 | 4 | 7 | 0 | 2 | 21 | 11 | 4 | 3 | 0 | 6 |
| 3 | 3 | 1 | 2 | 3 | 2 | 3 | 14 | 2 | 2 | 5 | 6 | 7 |
| 4 | 2 | 3 | 1 | 3 | 10 | 4 | 10 | 13 | 1 | 3 | 6 | 4 |
| 5 | 2 | 2 | 2 | 1 | 13 | 3 | 12 | 8 | 4 | 5 | 5 | 7 |
| 6 | 2 | 3 | 5 | 4 | 9 | 7 | 10 | 3 | 6 | 7 | 7 | 1 |
| 7 | 3 | 4 | 4 | 1 | 7 | 8 | 7 | 8 | 6 | 5 | 7 | 6 |
| 8 | 1 | 1 | 3 | 0 | 4 | 15 | 7 | 8 | 0 | 4 | 5 | 11 |
| 9 | 1 | 5 | 2 | 2 | 3 | 4 | 14 | - | 2 | 8 | 3 | 11 |
| 10 | 1 | 2 | 2 | 3 | 6 | 12 | 9 | 15 | 9 | 6 | 6 | 7 |
| 11 | 3 | 5 | 1 | 5 | 8 | 21 | 16 | 10 | 3 | 11 | 4 | 3 |
| 12 | 3 | 2 | 2 | 2 | 3 | 27 | 11 | 12 | 7 | 9 | 9 | 12 |
| 14 | 1 | 5 | 3 | 4 | 11 | 19 | 13 | 10 | 0 | 9 | 7 | 11 |
| 16 | 1 | 2 | 3 | 1 | 8 | 8 | 16 | 6 | 5 | 6 | 13 | 4 |
| 18 | 2 | 2 | 4 | 1 | 21 | 7 | 16 | 7 | 2 | 4 | 4 | 4 |
| 20 | 1 | 4 | 3 | 0 | 21 | 6 | 20 | 3 | 1 | 5 | 4 | 2 |
| 22 | 1 | 3 | 2 | 1 | 23 | 13 | 14 | 5 | 7 | - | 1 | 4 |
| 24 | 1 | 4 | 2 | 1 | 26 | 3 | 21 | 7 | 6 | - | 2 | 5 |
| 26 | 4 | 3 | 3 | 2 | 21 | 8 | 9 | - | 7 | - | 2 | 5 |
| 28 | 3 | 6 | 3 | 3 | - | - | 14 | - | 1 | - | - | 4 |
| Moyennes | 2 | 3 | 3 | 2 | 10 | 9 | 13 | 8 | 4 | 6 | 5 | 6 |
| Ecart type | 1 | 2 | 1 | 2 | 8 | 7 | 5 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

L'index mitotique de la peau de nos souris, s'il n'est pas influencé par le traitement à l'acétone, est augmenté significativement lors du traitement au benzo(a)pyrène ($F = 75,06$ et $32,32$ pour les souches SwE et R3 respectivement, pour 1 et 78 DL., $p = 0,01$). Les phénomènes d'initiation (benzacridine) et de promotion (huile de croton) ont un effet semblable plus discret mais significatif ($F = 16,78$ et $42,99$ pour les souches SwE et R3 respectivement, pour 1 et 78 DL., $p = 0,01$). Nous constatons d'autre part que nos deux souches réagissent de façon comparable en fonction des traitements (différence entre les souches : 1,08 pour 1 et 228 DL., $F_{table} = 3,89$ , $p = 0,05$).

## 3. Discussion

Tant du point de vue macroscopique que microscopique, la peau de nos souris réagit sous l'effet du benzo(a)pyrène et donne des épithéliomas dans les délais de 6 à 14 semaines environ, notre souche SwE étant nettement plus sensible que notre souche R3 .

L'examen de l'histogramme des fréquences moyennes des mitoses au niveau de l'épiderme (fig. II.7.) démontre la grande différence du comportement de l'index mitotique chez nos animaux en fonction des traitements :

### 3.1. Effet de l'acétone

Neukomm et coll. en 1957 ( 82 ) étudièrent l'effet de ce solvant sur des cultures de fibroblastes de souris et constatèrent une augmentation (environ 15%) de la croissance des cultures traitées par rapport aux témoins. Par contre l'acétone utilisé comme véhicule du méthylcholanthrène, ne modifie pas l'effet du cancérigène sur la croissance cellulaire.

Nous ne constatons pas de différence significative due au traitement à l'acétone que ce soit au niveau de l'épaisseur moyenne de l'épiderme ou de l'index mitotique.

### 3.2. Effet du benzo(a)pyrène (B(a)P)

L'action de ce cancérigène sur la division cellulaire est spectaculaire puisqu'elle multiplie par trois environ le nombre initial des mitoses. Un phénomène identique se répète si l'on traite les animaux par un seul badigeonnage au B(a)P puis par une exposition répétée à l'huile de croton (cocancérisation).

L'épaisseur de l'épiderme a une évolution parallèle, elle est triplée dans la mesure ou les épithéliomas ne sont pas encore apparents, ces derniers entraînant des modifications épidermiques importantes (Tableau II.2. souche SwE). Ces résultats sont en accord avec le travail de Major ( 71 ) sur la base duquel nous avons choisi notre méthodologie.

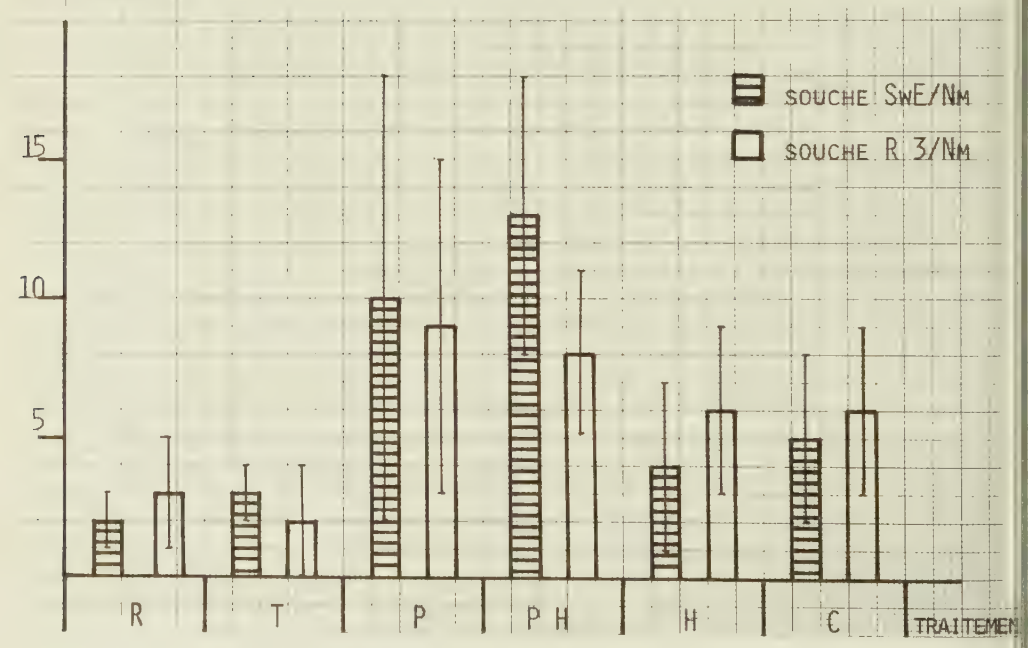
Marti en 1973, lors de son étude de la néoplasie expérimentale de l'épiderme du triton, montre que l'injection sous-cutanée de méthylcholanthrène multiplie par cinq le nombre initial des mitoses , 12 jours environ après le traitement. Cette réaction est donc semblable à celle que nous obtenons au niveau de la peau de souris badigeonnée au B(a)P ( 70 ).

### 3.3. Rôle de l'huile de croton et de la benzacridine

L'augmentation significative, à la fois de l'index mitotique et de l'épaisseur de l'épiderme que nous obtenons pour ces deux composés, nous permet de conclure que, tant le phénomène d'initiation que le phénomène de promotion entraînent une prolifération cellulaire.

Cependant, la similitude de cette prolifération dans nos deux souches, n'explique pas leur différence de sensibilité au B(a)P. Ce phénomène n'est donc pas le seul impliqué lors de la cancérisation.

Figure II. 7.: Histogramme : Fréquences moyennes des mitoses au niveau de l'épiderme en fonction des traitements.



## CHAPITRE III - ETUDE QUANTITATIVE DU DNA ET DES HISTONES ÉPIDERMIQUES DE SOURIS.

Les dosages de ces deux substances sont effectués au VICKERS sur nos animaux expérimentaux, comme nous l'avons décrit au chapitre I, sous 3.3. et 3.4.. Vingt noyaux interphasiques sont choisis au hasard dans la couche basale épidermique de chaque souris et analysés. Nous calculons leur quantité moyenne de DNA et d'histones (en u.a. par noyau). Les tableaux III.1. et III.2. reportent la moyenne globale et l'écart type de ces dosages par lot de 20 souris en fonction des divers traitements, et le rapport: $\frac{DNA}{histones}$ .

L'analyse statistique de ces résultats a été exécutée suivant le plan établi dans la méthodologie (2.1.1.) et les conclusions sont regroupées schématiquement dans les tableaux III.3. et III.4. .

### 1. Animaux non traités

On considére comme "non traitées" les souris qui n'ont subi que le traumatisme du rasage (Lot R). Sur la base des analyses de leurs noyaux épidermiques nous établissons les variations de leur taux de DNA et d'histones .

Tableau III. 1.: Souche SwE/Nm, dosages histochimiques du DNA et des histones dans les noyaux de la couche basale de l'épiderme de souris badigeonné par diverses substances.

Les concentrations en DNA par noyau /DNA/ et en histones par noyau /histones/ sont exprimées en u.a.. Les résultats moyens et leur écart type sont évalués sur 20 animaux à raison de 20 dosages par animal.

| LOT SwE | | /DNA/ U.A. | /HISTONES/ U.A. | /DNA/ / /HISTONES/ |
|---|---|---|---|---|
| R (RASAGE) | ♂ | 2,53 ± 0,15 | 1,38 ± 0,35 | 1,83 |
| | ♀ | 2,49 ± 0,18 | 1,52 ± 0,23 | 1,63 |
| T (ACETONE) | ♂ | 2,63 ± 0,16 | 1,25 ± 0,23 | 2,10 |
| | ♀ | 2,71 ± 0,21 | 1,38 ± 0,32 | 1,97 |
| P (B(A)P) | ♂ | 3,35 ± 0,25 | 0,88 ± 0,32 | 3,79 |
| | ♀ | 3,04 ± 0,19 | 0,88 ± 0,23 | 3,44 |
| PH (B(A)P + HUILE CROTON) | ♂ | 3,02 ± 0,33 | 0,78 ± 0,21 | 3,89 |
| | ♀ | 3,12 ± 0,31 | 1,02 ± 0,32 | 3,06 |
| H (HUILE DE CROTON) | ♂ | 2,97 ± 0,18 | 1,09 ± 0,17 | 2,73 |
| | ♀ | 3,09 ± 0,18 | 1,09 ± 0,22 | 2,83 |
| C (B A C) | ♂ | 3,06 ± 0,29 | 1,02 ± 0,27 | 2,99 |
| | ♀ | 3,09 ± 0,19 | 1,09 ± 0,37 | 2,82 |

Tableau III. 2.: Souche R3/Nm, dosages histochimiques du DNA et des histones dans la couche basale de l'épiderme de souris badigeonné par diverses substances (voir tableau III.1.)

| Lot R 3 | | [DNA] | [HISTONES] | [DNA] / [HISTONES] |
|---|---|---|---|---|
| R (RASAGE) | ♂ | 3,19 ± 0,24 | 1,43 ± 0,22 | 2,24 |
| | ♀ | 3,42 ± 0,32 | 1,50 ± 0,30 | 2,28 |
| T (ACETONE) | ♂ | 3,31 ± 0,23 | 1,40 ± 0,15 | 2,36 |
| | ♀ | 3,24 ± 0,26 | 1,51 ± 0,29 | 2,15 |
| P (B(A)P) | ♂ | 4,13 ± 0,54 | 0,87 ± 0,23 | 4,75 |
| | ♀ | 3,90 ± 0,34 | 0,91 ± 0,21 | 4,29 |
| PH (B(A)P + HUILE CROTON) | ♂ | 3,40 ± 0,25 | 1,17 ± 0,40 | 2,90 |
| | ♀ | 3,56 ± 0,35 | 1,07 ± 0,35 | 3,33 |
| H (HUILE DE CROTON ) | ♂ | 3,07 ± 0,23 | 1,28 ± 0,31 | 2,40 |
| | ♀ | 3,10 ± 0,25 | 1,13 ± 0,31 | 2,73 |
| C (B A C) | ♂ | 3,29 ± 0,37 | 1,41 ± 0,20 | 2,33 |
| | ♀ | 3,58 ± 0,31 | 1,28 ± 0,30 | 2,79 |

Tableau III. 3.: Conclusions de l'analyse statistique effectuée pour le dosage du DNA par noyau, en fonction des divers traitements et du matériel animal utilisé.

| CONCLUSIONS | F calculé | F table | P = ... |
|---|---|---|---|
| $\overline{/DNA/}$ ♂ ≡ $\overline{/DNA/}$ ♀ * | 1,08<br>1 et 455 DL | 3,86 | 0,05 |
| $\overline{/DNA/}$ SwE < $\overline{/DNA/}$ R3 | 27,35<br>1 et 455 DL | 6,70 | 0,01 |
| $\overline{/DNA/}$ R ≡ $\overline{/DNA/}$ T ≡ $\overline{/DNA/}$ H * | 2,71<br>2 et 174 DL | 3,06 | 0,05 |
| $\overline{/DNA/}$ C ≡ $\overline{/DNA/}$ PH * | 0,038<br>1 et 120 DL | 3,94 | 0,05 |
| $\overline{/DNA/}$ P > $\overline{/DNA/}$ PH * | 17,19<br>1 et 115 DL | 6,90 | 0,01 |
| $\overline{/DNA/}$ PH > $\overline{/DNA/}$ T ou R * | 86,153<br>1 et 274 DL | 6,73 | 0,01 |

Abréviations : > Supérieur à
< Inférieur à
≡ Identique

P = probabilité
F = variable de Snédécor
$\overline{/\ /}$ = concentration
DL = degrés de liberté

* Ces analyses statistiques concernent les souches SwE et R 3.

Tableau III. 4.: Conclusions de l'analyse statistique effectuée pour le dosage des histones en fonction des divers traitements et du matériel animal utilisé.

| CONCLUSIONS | $F_{calculé}$ | $F_{table}$ | P = ... |
|---|---|---|---|
| / histones / ♂ ≡ / histones / ♀ * | 1,52<br>1 et 417 DL | 3,87 | 0,05 |
| / histones / SwE ≡ / histones / R3 | 3,41<br>1 et 417 DL | 3,87 | 0,05 |
| / histones / R ≡ / histones / T * | 3,14<br>1 et 101 DL | 3,94 | 0,05 |
| / histones / H ≡ / histones / C * | 1,20<br>1 et 104 DL | 3,94 | 0,05 |
| / histones / R ou T > / histones / H ou C * | 66,55<br>1 et 245 DL | 6,74 | 0,01 |
| / histones / R ou T > / histones / P ou PH * | 55,39<br>2 et 159 DL | 4,75 | 0,01 |

Abréviations : Voir Tableau III. 3.

* Ces analyses statistiques concernent les souches SwE et R3.

1.1. Ploïdie des noyaux épidermiques interphasiques

La quantité de DNA des noyaux haploïdes a été déterminée sur les spermatozoïdes de nos souris. Afin de vérifier que nous sommes en face d'une seule population de noyaux, nous avons appliqué la méthode graphique déjà recommandée et utilisée par Neukomm ( 83 ). Celle-ci consiste à reporter les fréquences cumulées du collectif étudié dans un graphique, portant en ordonnées une échelle d'unités tirées de l'intégrale de Gauss et en abcisses une échelle d'unités cartésiennes (Tableau III.5. et figure III.1.). Nous pouvons conclure ainsi que nous sommes bien en présence d'une seule famille de noyaux haploïdes qui suivent une distribution normale. La quantité de DNA par noyau déterminée graphiquement est de 1,3 u.a. pour nos deux souches. Le calcul de la valeur moyenne et de son écart type nous donne $1{,}38 \pm 0{,}32$ et montre que nous avons une bonne corrélation entre ces deux méthodes. Par le même procédé, nous avons étudié nos noyaux épidermiques de souris "non traitées". Les collectifs des souches SwE et R3 sont composés chacun d'une seule famille dont la concentration en DNA respective est de $2{,}4 \pm 0{,}6$ u.a. et $3{,}0 \pm 0{,}9$ u.a. et correspondent bien à un état diploïde (Figure III. 2.).

Le taux moyen d'histones de ces groupes nucléaires qui est de $1{,}4 \pm 0{,}3$ unités environ a été étudié parallèlement à celui du DNA (Fig. III.3.). Nous observons que nous sommes en présence d'une seule famille de noyaux. La discontinuité apparaissant au début des courbes de Gauss peut s'expliquer par le fait que nous travaillons sur des sections fines de nos organes dont les noyaux sont parfois incomplets. La mesure de quantités de DNA ou d'histones trop faible se traduit donc graphiquement par l'apparition d'une famille à petit capital nucléaire .

Tableau III. 5.: Répartition des catégories de noyaux haploïdes (spermatozoïdes de souris) à teneur croissante de DNA. Calcul des fréquences absolues et relatives cumulées .

| Quantité de DNA u.a. | Nombre de noyaux / catégorie | | Fréquences cumulées : nb | | % | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | SwE | R3 | SwE | R3 | SwE | R3 |
| 0,8 - 0,9 | 6 | | 6 | | 5 | |
| 0,9 - 1,0 | 5 | 13 | 11 | 13 | 10 | 12 |
| 1,0 - 1,1 | 16 | 16 | 27 | 27 | 27 | 25 |
| 1,1 - 1,2 | 9 | 12 | 36 | 39 | 32 | 36 |
| 1,2 - 1,3 | 13 | 10 | 49 | 49 | 43 | 45 |
| 1,3 - 1,4 | 13 | 10 | 62 | 59 | 54 | 54 |
| 1,4 - 1,5 | 15 | 7 | 77 | 66 | 68 | 61 |
| 1,5 - 1,6 | 9 | 13 | 86 | 79 | 75 | 73 |
| 1,6 - 1,7 | 13 | 6 | 99 | 85 | 87 | 78 |
| 1,7 - 1,8 | 5 | 8 | 104 | 93 | 91 | 85 |
| 1,8 - 1,9 | 4 | 5 | 108 | 88 | 95 | 90 |
| 1,9 - 2,0 | 5 | 3 | 113 | 101 | 99 | 93 |
| 2,0 - 2,1 | 1 | 6 | 114 | 107 | 100 | 98 |
| 2,1 - 2,2 | | 2 | | 109 | | 100 |

Figure III. 1.. Courbes des fréquences cumulées de la quantité de DNA des noyaux de spermatozoïdes montrant l'existence d'une seule population pour chaque souche.

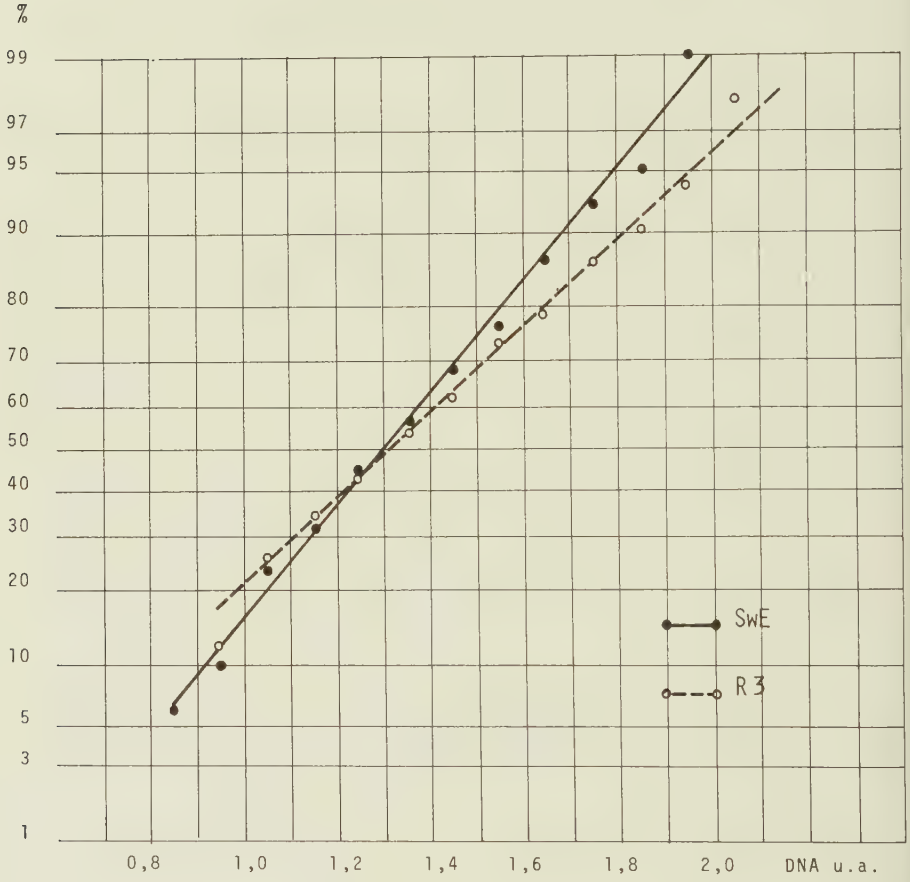


Figure III. 2.: Courbes des fréquences cumulées de la quantité de DNA des noyaux "non traités" de l'épiderme.

Il existe en réalité une seule population nucléaire pour chaque souche.

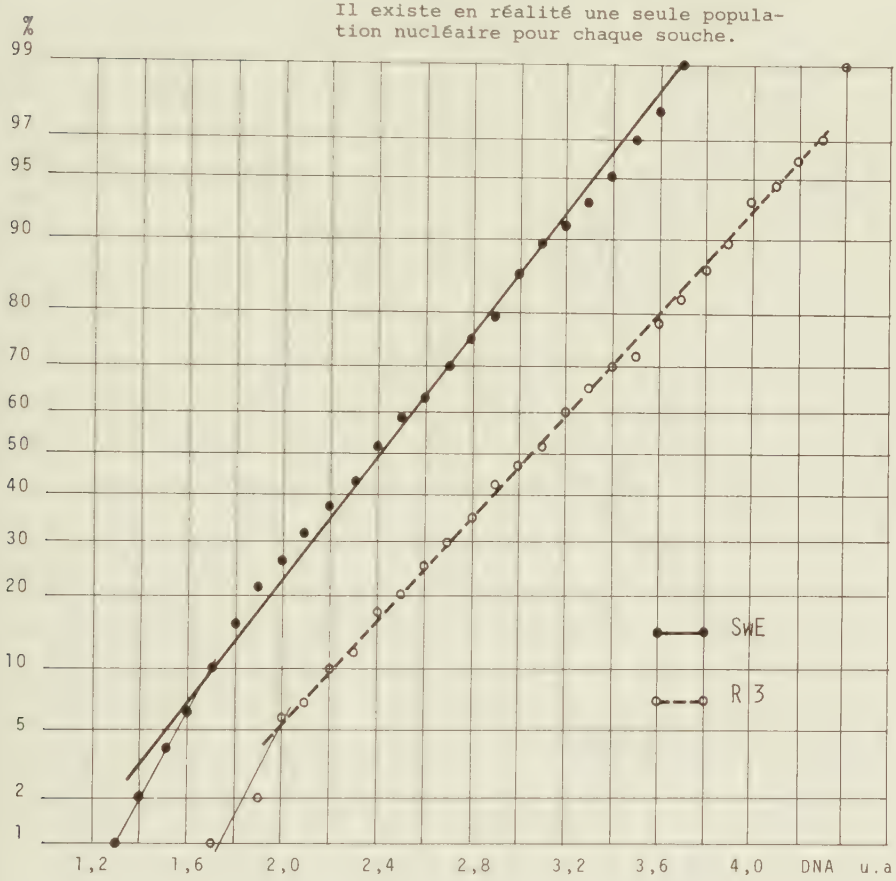


Figure III. 3.: Courbes des fréquences cumulées de la quantité d'histones nucléaires de l'épiderme des animaux "non traités".

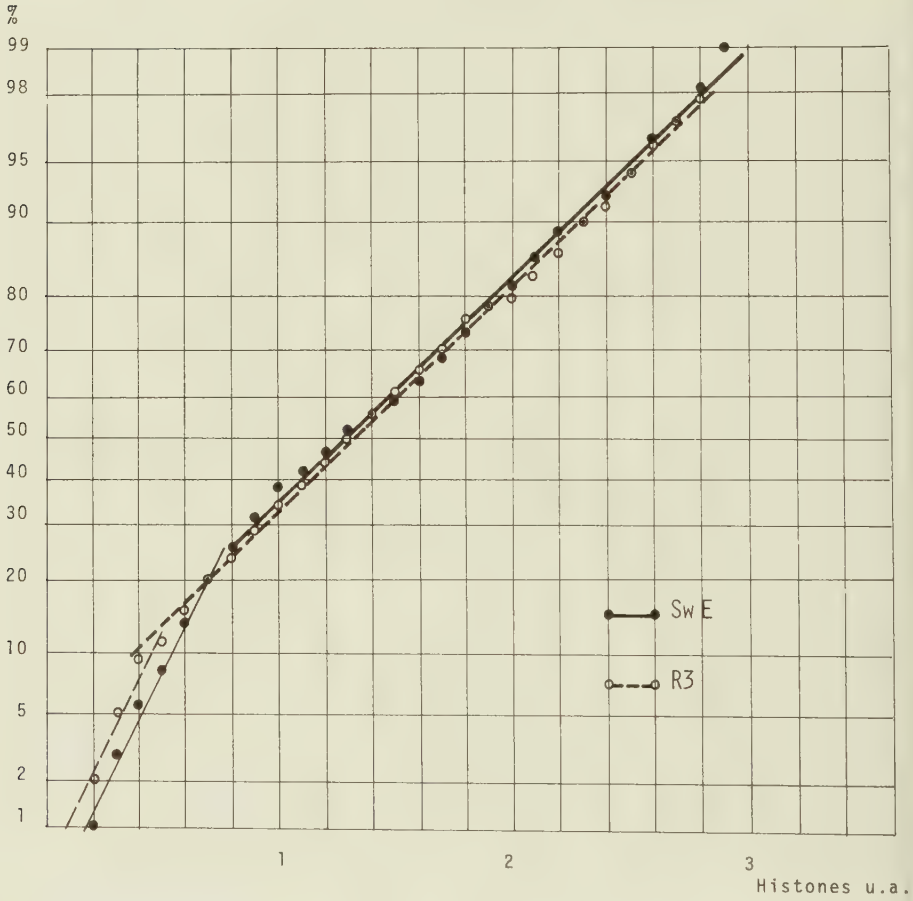


Figure III. 4.: Courbes des fréquences cumulées de la quantité de DNA des noyaux traités au B(a)P mettant en évidence deux populations nucléaires a et b bien distinctes et une population a' mal définie.

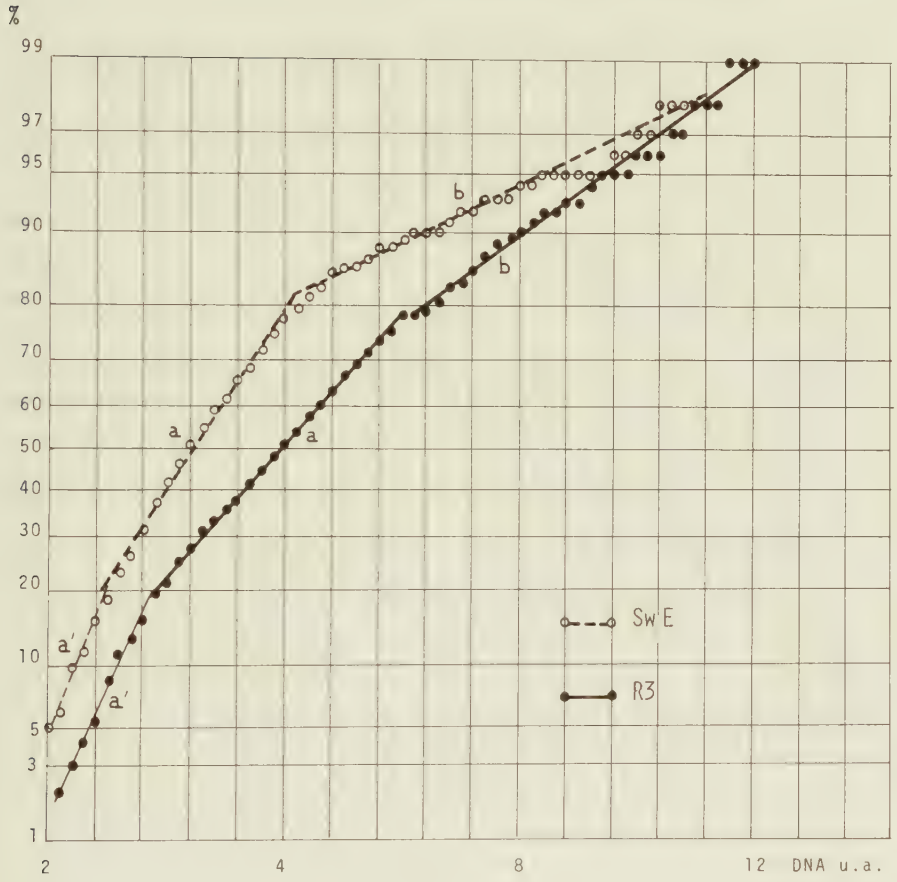


Figure III. 5.: Courbes des fréquences cumulées de la quantité d'histones nucléaires de l'épiderme traité au B(a)P.

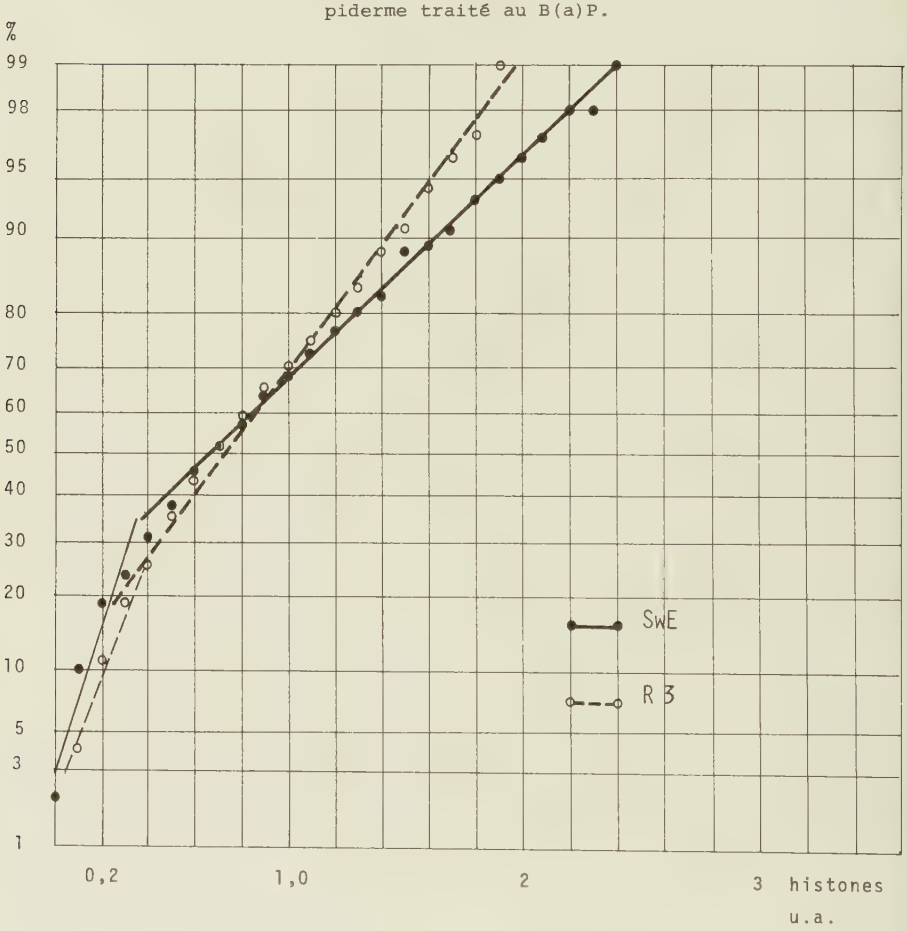


Figure III. 6.: Courbes des fréquences cumulées de la quantité de DNA nucléaire de l'épiderme traité à la benzacridine. Deux familles nucléaires a et b apparaissent chez la souche SwE uniquement.

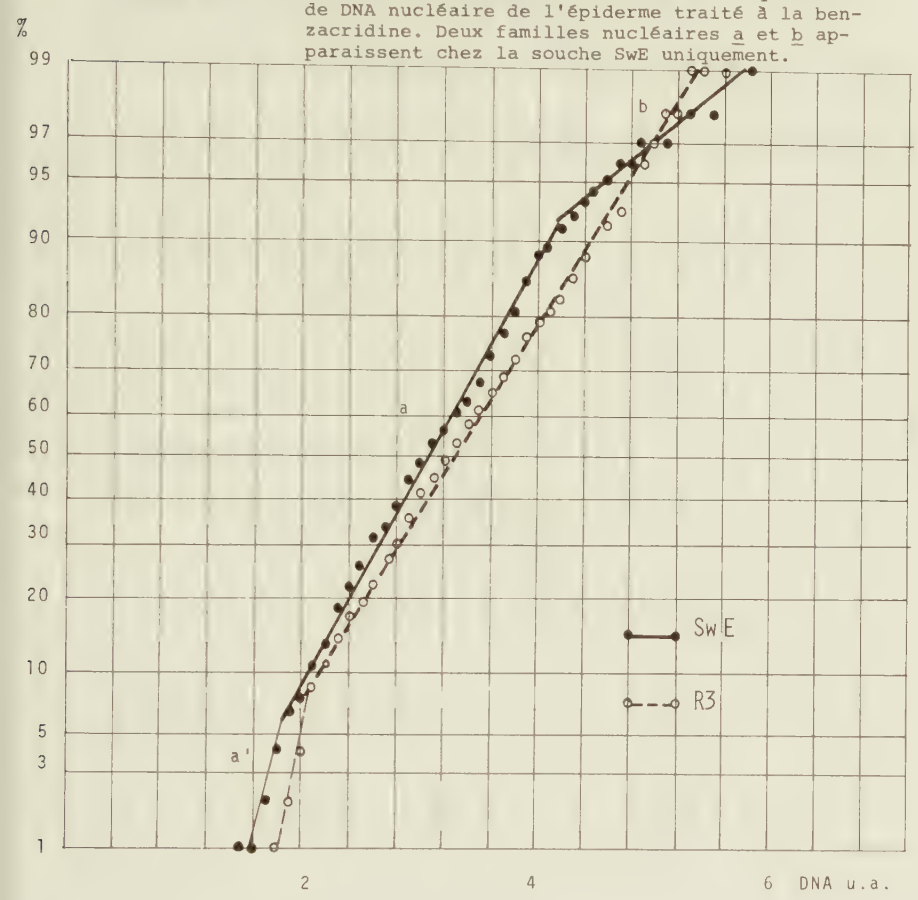
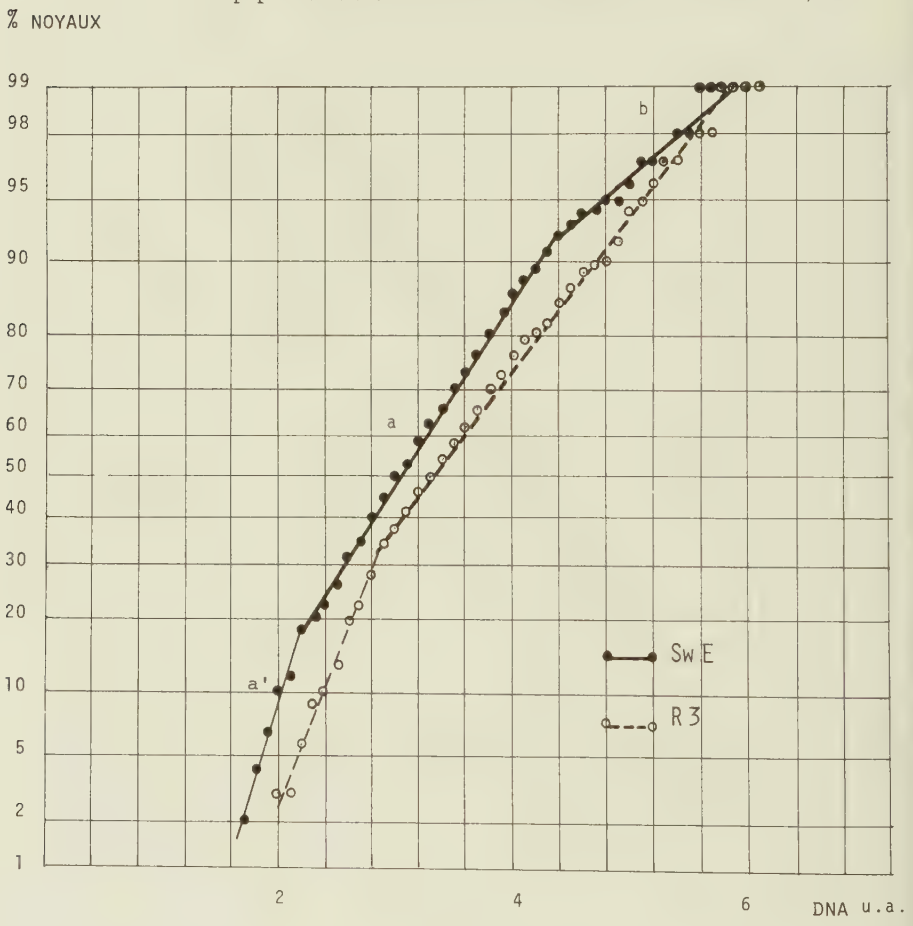


Figure III. 7.: Courbes des fréquences cumulées de la quantité de DNA nucléaire de l'épiderme traité au benzo(a)pyrène suivi de l'huile de croton mettant en évidence deux populations nucléaires a et b dans la souche SwE/Nm.



1.2. Variations d'un individu à l'autre

Ces variations qui sont de l'ordre de 7% pour le DNA et de 20 % pour les histones par noyau épidermique sont estimées sur la base des écarts types des valeurs regroupées dans les tableaux III.1. et III.2.

1.3. Variations sexuelles

L'analyse statistique (Tableaux III.3. et III.4.) prouve que les deux substances dosées ne sont pas dépendantes du sexe .

1.4. Variations raciales

Nous constatons une différence raciale hautement significative au niveau du DNA des noyaux "non traités", alors que le taux moyen d'histones reste identique pour nos deux souches.

2. Effet du traitement à l'acétone

Ce solvant est absolument sans action que ce soit sur le taux de DNA ou d'histones des noyaux de l'épiderme traité.

3. Effet de la cancérisation

3.1. Variations dues à un cancérigène fort (B(a)P)

L'examen graphique (Fig. III.4.) des fréquences cumulées des diverses classes de DNA nucléaire met en évidence deux populations distinctes a et b qui contiennent respectivement :

$a = 3,09 \pm 0,64$ $b = 5,87 \pm 1,37$ unités de DNA pour la souche SwE

$a = 3,64 \pm 0,81$ $b = 6,44 + 1,36$ unités pour la souche R3.

Le rapport $\frac{a}{b}$ qui est de 1,9 et 1,8 pour les deux souches permet de conclure que nous sommes en présence de noyau 2N et 4 N. La famille a' pauvre en DNA, observée en début de la courbe de Gauss, et mal définie, semble comme pour les histones, être formée de noyaux amputés lors de la confection des coupes. Nous n'en avons donc pas tenu compte.

Le taux d'histones de ces mêmes noyaux estimé par notre méthode colorimétrique ne semble pas fluctuer de la même manière. Nous sommes en présence d'un seul groupe nucléaire contenant en moyenne $0,9 \pm 0,2$ unités d'histones soit une quantité significativement inférieure à celle des animaux "non traités" (Figure III.5.).

3.2. Variations dues à un cancérigène faible (3,4 benzacridine).

Cette substance administrée pendant une période limitée n'a en fait qu'un rôle initiateur. Son effet sur le DNA plus discret que celui d'un cancérigène fort (Figure III.6.) se traduit par l'apparition de la famille b dans la souche SwE, mais pas dans la souche R 3. Nous confirmons ainsi une fois de plus la moindre sensibilité de notre souche R 3 au phénomène de cancérisation.

Le taux d'histones nucléaires est diminué significativement dans nos conditions expérimentales (Tableau III.4.).

4. Phénomène de cocancérisation

4.1. Effets d'un cocancérigène seul (huile de croton)

L'analyse statistique nous prouve que les noyaux subissant l'influence de l'huile de croton conservent un

taux moyen de DNA comparable à celui des noyaux " non traités" (Tableau III.3.). Leurs histones sont par contre diminuées significativement.

4.2. Effets combinés d'un cancérigène et d'un cocancérigène (carcinogénèse en deux phases).

Le taux global de DNA nucléaire de l'épiderme traité à la benzacridine, comme le prouve la statistique, est semblable à celuit du lot PH. Ces résultats sont confirmés graphiquement (Fig. III.7.), nous voyons apparaître la famille b uniquement dans la souche SwE.

## 5. Discussion et conclusions

### 5.1. Le D N A

Le DNA est certainement le constituant cellulaire pour lequel nous possédons le plus grand nombre de données quantitatives, tant par voie biochimique qu'histochimique. Le problème de la constance de cette substance au niveau des noyaux des tissus d'un même indivivu a été très controversé entre les années 1950 à 1965 ( 2 )( 60 )( 66 )(85). Fautrez ( 37 ) en 1966, passe en revue la littérature existant à ce sujet et met en évidence les nombreuses exceptions à cette constance. La présence de plusieurs populations de 2,4,8,voire 16 fois la teneur en DNA haploïde a été reconnue très tôt dans les organes normaux des rongeurs principalement. Il a été également démontré que le taux de DNA nucléaire de certains tissus était fréquemment modifié dans diverses conditions physiologiques (foie en régénération) ( 96 ), pathologiques ( 35 )( 39 )( 62 ) ou expérimentales particulières (traitements par des substances chimiques)( 31 ) ( 41 )( 48 )( 87 )( 97 )(116)(121) .

Tableau III. 6.: Fréquences d'apparition de la population nucléaire "b" à forte teneur en DNA ( % b) en fonction des badigeonnages et des traitements.

| Nombre de badigeonnages | L O T P | | L O T PH | L O T C |
|---|---|---|---|---|
| | % b SwE | % b R 3 | % b SwE | % b SwE |
| 1 | 15 | 34 | 13 | 5 |
| 2 | 11 | 54 | 37 | 10 |
| 3 | 23 | 44 | 11 | 10 |
| 4 | 15 | 27 | 16 | 4 |
| 5 | 10 | 38 | 12 | 13 |
| 6 | 11 | 23 | 4 | 9 |
| 7 | 23 | 25 | 4 | 13 |
| 8 | 23 | 5 | 7 | 14 |
| 9 | 10 | 5 | 12 | 10 |
| 10 | 22 | 5 | 7 | 13 |
| 11 | 15 | 24 | 2 | 0 |
| 12 | 9 | 8 | 0 | 5 |
| 14 | 32 | 15 | 7 | 15 |
| 16 | 15 | 31 | 13 | 14 |
| 18 | 15 | 16 | 9 | 15 |
| 20 | 20 | 26 | 5 | 8 |
| 22 | 29 | 36 | 11 | 0 |
| 24 | 30 | 32 | 7 | 11 |
| 26 | 18 | 24 | 17 | 5 |
| 28 | 29 | 24 | 9 | 3 |
| % b moyen | 19 | 25 | 10 | 9 |

Figure III. 8.: Etude de l'apparition de la famille "b" en fonction des badigeonnages pour les traitements C, PH, et, P.(le % de noyaux "b" est calculé en fonction du nombre total des noyaux mesurés)

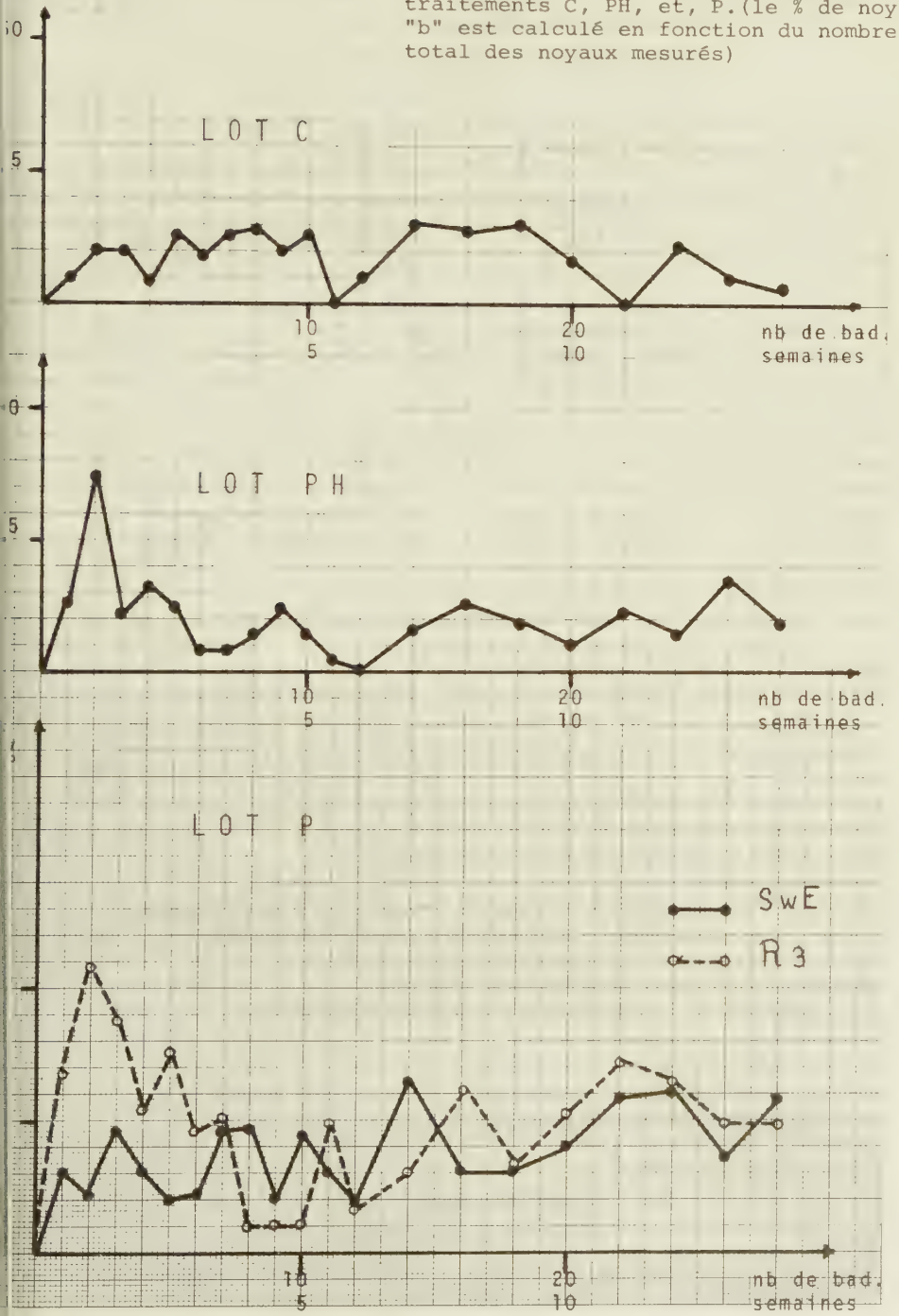


Tableau III. 7.: Quantité moyenne de DNA nucléaire coloré au Feulgen, des familles a et b en fonction des traitements P, PH, et C (pour les autres traitements voir tableaux III.1. et III.2).

| L O T | Souche | Famille a | | Famille b | | b/a |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | /DNA/ u.a. | s | /DNA/ u.a. | s | |
| P | SwE | 3,09 | 0,64 | 5,87 | 1,37 | 1,9 |
| | R 3 | 3,64 | 0,81 | 6,44 | 1,36 | 1,8 |
| PH | SwE | 3,03 | 0,69 | 5,30 | 0,85 | 1,8 |
| C | SwE | 3,00 | 0,68 | 5,40 | 1,29 | 1,8 |

Tableau III. 8.: Comparaison entre l'activité mitotique et la présence de la famille b au niveau de l'épiderme en voie de cancérisation .

| L O T | Index mitotique Moyen % | | Famille b % du total des noyaux mesurés | |
|---|---|---|---|---|
| | SwE | R 3 | SwE | R 3 |
| P | 9 | 13 | 19 | 25 |
| PH | 13 | 8 | 10 | 0 |
| C | 5 | 6 | 9 | 0 |

La méthode d'analyse graphique sur papier de probabilité des courbes de fréquences cumulées, recommandée par Schröder en 1957 (105) et appliquées par Neukomm et Wavre en 1960 ( 83 ) facilite l'étude des distributions mixtes des teneurs en DNA des noyaux. Son application à un collectif important (800 noyaux environ par traitement) nous a permis de mettre en évidence une famille nucléaire "b" dans les lots traités au B(a)P, à la benzacridine et au B(a)P suivi de l'huile de croton. Cette nouvelle famille dont l'apparition précoce a été étudiée en fonction des badigeonnages (Fig. III.8. et Tableau III.6.) a un capital en DNA qui est environ 1,8 fois celui des noyaux "a" diploïdes (Tableau III.7.). Nous sommes donc en présence de noyaux préprophasiques qui seraient dans la phase G2 de leur cycle de duplication du DNA.

Or, il est connu que, dans les tissus à activité mitotique intense, le moment où se fait la synthèse du DNA se déplace de plus en plus vers le début de l'intercinèse ( 37 ). Il en résulte une phase G1 très courte et une phase G2 prolongée. Si nous comparons les index mitotiques moyens des lots ayant subi les divers traitements, avec les pourcentages moyens de noyaux "b" de ces mêmes lots (Tableau III.8.), nous pouvons conclure, vu le manque de relation entre ces deux données, que la famille "b" est due soit à un prolongement exagéré de la phase G2 préprophasique, soit à l'apparition d'une nouvelle classe nucléaire tétraploïde. Ces mécanismes déjà décrits à plusieurs reprises ( 38 )( 61 )( 62 )( 97 ) ( 35 ) ne sont pas en fait spécifiques de la cancérisation, mais plutôt de la prolifération cellulaire.

L'analyse statistique des valeurs moyennes globales du DNA des noyaux épidermiques en fonction des traitements (Tableau III.3.) donne les mêmes résultats que l'analyse graphique (identité de la réaction des lots PH et C, réaction plus intense du lot P) .

Elle nous montre en plus que le taux de DNA moyen estimé par la coloration de Feulgen dans la famille "a", est significativement plus élevé dans les lots en voie de cancérisation (P,PH, et C) que dans les lots témoins (R et T).

Nous observons donc une augmentation intrinsèque du DNA en surplus de l'accélération de la duplication de ce dernier. Ce phénomène constaté par la plupart des auteurs précités peut trouver une explication dans le travail de Caputo ( 16 ) qui démontre que trois types de synthèses du DNA peuvent être présents dans une cellule :

1. Une synthèse normale, semi-conservative, aboutissant en l'absence de toute stimulation extérieure à la formation de nouvelles molécules de DNA.
2. Une synthèse non programmée, produite à la suite d'irradiations ou spontanément dans les phases non-S du cycle.
3. Une réplication réparative qui tend à la reconstruction des molécules de DNA endommagées par des agents chimiques, physiques ou biologiques.

En conséquence, nous pouvons tirer les conclusions suivantes de nos résultats:

1. L'épiderme normal de souris possède des noyaux interphasiques diploïdes dont la quantité moyenne de DNA (Feulgen) est stable entre les individus d'une même souche, alors qu'elle est significativement différente d'une souche à l'autre.
2. Le traitement à l'acétone ou à l'huile de croton à de faibles concentrations ne modifie pas ce taux de DNA nucléaire.
3. L'application du benzo(a)pyrène entraîne rapidement l'apparition d'une nouvelle famille "b" chez nos deux souches, dont le capital en DNA est 1,8 fois celui

des noyaux "a" diploïdes.

4. Le traitement par un cancérigène faible (effet initiateur) ou par un cancérigène fort suivi de l'huile de croton entraîne l'apparition de la famille "b" uniquement chez notre souche Swiss, qui est la plus sensible, à une fréquence de 10% environ.

5. La quantité moyenne de DNA des noyaux diploïdes (famille "a") cancérisés ou en voie de cancérisation est augmentée significativement par un processus de synthèse apparaissant, on le suppose, en dehors de la phase S du cycle.

6. Il existe une bonne corrélation entre ces résultats et ceux trouvés par Marti ( 70 ) au niveau de l'épiderme du triton sous l'effet d'injections d'huile d'olive ou de méthylcholanthrène dissout dans l'huile d'olive.

5.2. Les histones

Nous savons actuellement qu'il existe cinq types d'histones, isolées principalement à partir du thymus de veau, dont la classification générale et la nomenclature ont été reportées récemment par Spelsberg (110)(Tableau III.9.).

Tableau III. 9. : Nomenclature et caractérisation des histones du thymus de veau (Spelsberg (110)).

| Nomenclature Actuelle | Particularités | Lysine / Arginine | Mol./100 mol. histones totales |
|---|---|---|---|
| KAP ou H1 | très riche en lysine | 20 - 22 | 13,3 |
| KAS ou H2 B | assez riche en lysine | 2,5 | 24,6 |
| LAK ou H2 A | riche en lysine et arginine | 1 - 1,2 | 20,0 |
| ARE ou H3 | riche en arginine | 0,7- 0,8 | 18,3 |
| GRK ou H4 | riche en glycine et arginine | 0,7- 0,8 | 23,8 |

Par des méthodes biochimiques, il a été montré que ces protéines basiques sont localisées principalement au niveau de la chromatine et du nucléole ( 15 ) ( 76 ) ( 92 ), qu'elles seraient synthétisées dans ce dernier juste avant la duplication du DNA ( 49 ), et que le rapport histone/ DNA est double au niveau du nucléole comparé à la chromatine. Hnilica ( 49 ) et Spelsberg (110) dans leur étude de "la fonction des histones" rapportent les connaissances actuelles permettant d'en élucider partiellement les mécanismes en mettant en évidence l'action inhibitrice de ces substances sur la synthèse du RNA et du DNA. Il semble que ce sont avant tout les histones riches en lysine (KAP) qui sont responsables de cette inhibition de la duplication du DNA, inhibition qui peut du reste être levée par phosphorylation de la KAP au niveau de la sérine.

Les connaissances biochimiques sur les histones des tissus tumoraux sont moins nombreuses et souvent contradictoires. En 1964, Busch et Steele ( 15 ) mettent en évidence une histone nouvelle, assez riche en lysine dans les tissus tumoraux. Mais peu après, Hnilica ( 49 ) démontre que cette protéine est due en fait à une contamination. Marks en 1974 ( 69 ) analyse les histones H1 au niveau de la thyroïde humaine normale, hyperplasique et néoplasique et ne trouve pas de modification de leur taux global, bien que ce type d'histone soit connu pour inhiber la synthèse du DNA. La quantité de cette protéine devrait d'après cet auteur être en relation inverse avec la vitesse de division cellulaire du tissu considéré. Il nous fait cependant remarquer que la thyroïde, même néoplasique, garde un index mitotique faible.

L'étude histochimique des histones nous fournit moins de résultats que l'étude biochimique. De nombreux auteurs utilisèrent la technique du fast green FCF ( 1 ) qui fut violemment critiquée par Prentø ( 91 ) et Noeske ( 77 ). En 1954 déjà, Bloch et Godman ( 10 ) montrèrent

que si la coloration du fast green suivait les lois de Lambert-Beer sur des histones purifiées, des interférences étaient possibles avec des substances acides autres que les acides nucléiques. Cette technique d'autre part ne colore pas toutes les histones (Bloch et Hew(11 ) ). Ces auteurs montrent que le DNA et les "histones- fast green" ont la même distribution dans les noyaux fixés à la formaldéhyde et qu'ils sont synthétisés ensemble avant la division cellulaire. Desai et coll. ( 29), ainsi que Rohrbach et coll. ( 97) constatent par la suite que le rapport "DNA-Feulgen"/"histones-fast green" reste constant aussi bien dans les cellules normales que tumorales.

Spicer en 1961 (112) lors de la mise au point de la coloration au Biebrich scarlet que nous avons utilisée,montre que ce colorant se fixe principalement sur les histones riches en lysine à PH 9,5 et que l'exposition des noyaux à la formaldéhyde inhibe cette réaction. Il démontre dans un travail ultérieur (111) que le fast green ne colore pas ces mêmes protéines basiques localisées dans la chromatine et le nucléole, et masquées par la formaline, mais avant tout des histones riches en arginine. En 1963 Winkelmann et Spicer (126) prouvent que cette coloration spécifique suit les lois de Lambert-Beer, ce qui est confirmé par notre travail. Il n'existe, à notre connaissance, aucune étude des histones de cellules tumorales par cette technique.

La diminution significative des "histones-Biebrich scarlet" que nous observons dans les noyaux de l'épiderme de nos souris traité par divers cancérigènes paraît être en opposition avec les résultats trouvés à l'aide du fast green. Cette contradiction est levée si l'on considère que l'on ne dose pas le même type d'histones par chacune des techniques. Or nous savons que le Biebrich scarlet colore avant tout les histones riches en lysine et qu'elles sont impliquées dans un phénomène d'inhibition de la synthèse du DNA. Une diminution de ce

type de protéines entraînerait donc théoriquement une accélération de l'activité de la DNA-polymérase ( 49). Ceci expliquerait le phémomène de prolifération cellulaire et l'augmentation intrinsèque du DNA que l'on constate lors de la carcinogénèse.

Les histones riches en arginine que met en évidence le fast green (111) ne seraient pas diminuées lors de la cancérisation. Or il est prouvé que si ces substances ont un rôle de répresseur pour la synthèse du RNA, elles sont totalement inactives sur le DNA ( 49). Small (109) démontre de plus que les histones H4 riches en arginine sont capables de se lier à des hydrocarbures polycycliques tels que le benzo(a)pyrène, le pyrène, l'anthracène et le 9-méthylcholanthrène. Elles auraient en réalité un pouvoir cocancérigène potentiel (Lavelle ( 57)), ainsi qu'un rôle de transporteur des macromolécules au travers des membranes.

Les conclusions suivantes découlent de cette discussion et de nos résultats :

1. Les histones colorées au Biebrich scarlet, qui sont principalement des histones riches en lysine, sont stables au niveau des noyaux épidermiques de nos souris, quelque soit leur sexe et leur souche.
2. Le traitement à l'acétone ne modifie pas ces histones.
3. Les phénomènes de cancérisation (P), de cocancérisation (PH), d'initiation (C) ou de promotion (H) diminuent significativement ces histones ce qui entraîne une accélération de la synthèse du DNA.

# CHAPITRE IV - ETUDE DE L'ACTIVITÉ PHOSPHOMONOESTÉRASIQUE NON SPÉCIFIQUE AU NIVEAU DE LA PEAU DE LA SOURIS TRAITÉE OU NON.

Les dosages histochimiques des activités enzymatiques ont été exécutés au niveau du derme et du follicule pileux de chacun des animaux expérimentaux, comme indiqué dans la méthodologie (3.5.3. et 3.5.4.). Les résultats donnés dans les tableaux IV.1. et IV.2. correspondent à une absorbance moyenne de la zone à mesurer par unité de surface (en u.a.). Chaque valeur reportée représente ainsi la moyenne et l'écart type de l'activité enzymatique, calculée sur la base de 20 animaux de chaque lot, en fonction des sexes, des souches et des traitements. Nous avons comparé ces résultats entre eux par une série d'analyses de variance comme prévu dans le plan établi au chapitre I (2.2.1.). Les conclusions de ces analyses statistiques sont regroupées schématiquement dans les tableaux IV.3. et IV.4..

Les animaux "R" (rasages) qui seront considérés comme "non traités" nous permettront de localiser nos deux types d'enzymes dans la peau normale et d'étudier leur évolution en fonction des divers traitements.

## 1. LOCALISATION DES ENZYMES ET ACTIVITE NORMALE CHEZ LA SOURIS

### 1.1. Localisation

#### 1.1.1. Phosphatase acide

Ce groupe d'enzymes est présent dans la cellule au niveau des lysosomes principalement et de l'appareil de Golgi (23)(53)(113). Nous avons observé dans la peau de nos souris une activité faible de l'épiderme, et forte au

niveau du follicule pileux et du derme (mastocytes et fibrocytes)(Figure IV.1.), ces deux derniers sites correspondant aux zones qui furent mesurées.

1.1.2. Phosphatase alcaline

L'activité phosphatasique alcaline est nulle au niveau de l'épiderme normal. Elle est faible dans le tissu conjonctif entourant la base du follicule pileux. Les capillaires sanguins dermiques montrent une forte activité (Figure IV.2.).

1.1.3. Artefacts de colorations

Bien que ni Barka et Anderson ( 6 ), ni Stutte (115), lors de la mise au point de leur technique respective n'aient constaté d'artefacts de colorations, nous avons par mesure de prudence, exécuté une série de contrôles pour chacune des réactions enzymatiques. Nous observons :

a) coupes de peau + réactif sans substrat : coloration nulle
b) coupes de peau + réactif sans colorant : coloration nulle
c) coupes de peau inactivées par la chaleur (30 min. à 60°): légère coloration des 2 types d'enzymes dans tous les sites décrits.
d) coupes de peau inactivées par la chaleur (40 min. à 60°) : coloration nulle.

Il n'y a donc pas d'artefacts de coloration. D'autre part, en vertu de la durée d'incubation de 10 minutes seulement, que nous avons pratiquée pour chaque coloration, il n'y a pas de fausses localisations par diffusion.

1.2. Activité normale chez la souris

1.2.1. Variations individuelles

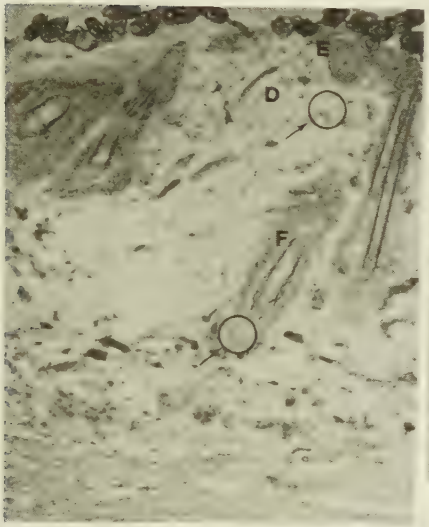
L'activité phosphatasique acide ou alcaline de la peau varie en moyenne de 20% d'une souris à l'autre et ceci pour chacune des deux souches (Tableaux IV.1 et IV.2).

Figure IV.1. : Localisation de l'activité phosphatasique acide dans dans la peau de la souris.

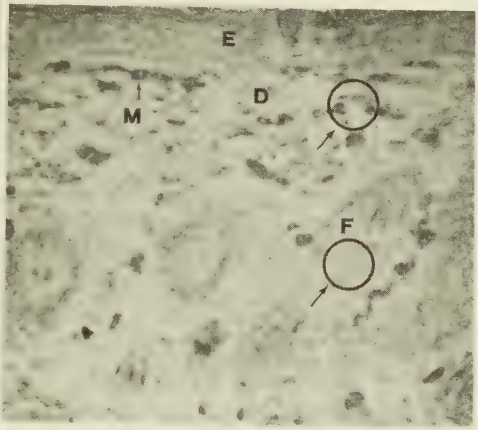
**E** = épiderme. **D** = derme. **H** = hypoderme

**F** = follicule pileux. **M** = mastocyte

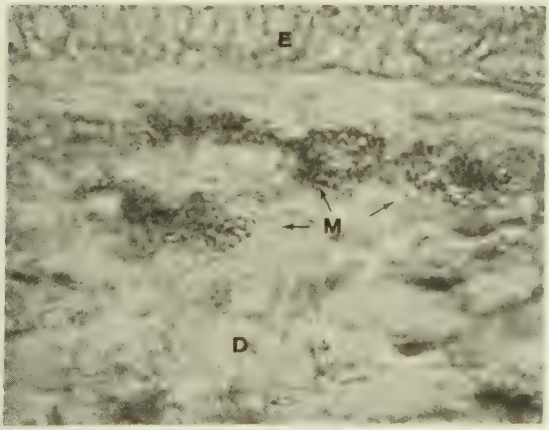
= surface mesurée




A




B




C

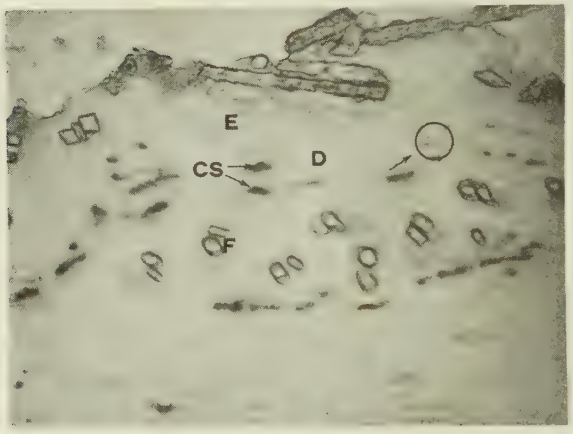
A. Peau normale : faible activité épidermique et dermique. Activité plus forte au niveau du follicule pileux (125 X).

B. Peau traitée au B(a)P : augmentation de l'activité dermique (250 X)

C. Peau traitée au B(a)P : localisation de l'activité dans les mastocytes (M) situés directement sous l'épiderme (625 X).

*les clichés couleurs peuvent être demandés à l'auteur.

Figure IV. 2. : Localisation de l'activité phosphatasique alcaline dans la peau de la souris.
**E** = épiderme. **D** = derme. **F** = follicule pileux. **CS** = capillaires sanguins.
◯ = zone mesurée.




A

B

A. Peau normale : activité nulle dans l'épiderme, mais forte activité dans les capillaires sanguins (125 X).

B. Peau traitée au B(a)P : forte activité dans le tissu conjonctif entourant la base du follicule pileux (voir fig. I.20.) (500 X).

*les clichés couleurs peuvent être demandés à l'auteur.

Tableau IV.1.: Dosages histochimiques de la phosphatase acide dans la peau de la souris au niveau du derme et du follicule pileux.

Les résultats sont exprimés en absorbance (u.a.) par unité de surface colorée : rapport $\frac{A}{S}$ moyen (des valeurs lues sur le Vickers) calculé sur 20 animaux de chaque lot.

* Ecart type.

| LOT | | DERME | | FOLLICULE PILEUX | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | SwE $\frac{A}{S}$ | R 3 $\frac{A}{S}$ | SwE $\frac{A}{S}$ | R 3 $\frac{A}{S}$ |
| R (RASAGE) | ♂ | 0,88 ± 0,20* | 0,83 ± 0,13 | 1,58 ± 0,38 | 1,50 ± 0,24 |
| | ♀ | 0,94 ± 0,09 | 0,92 ± 0,12 | 1,53 ± 0,51 | 1,38 ± 0,25 |
| T (ACÉTONE) | ♂ | 0,85 ± 0,12 | 0,80 ± 0,10 | 1,51 ± 0,33 | 1,42 ± 0,26 |
| | ♀ | 0,91 ± 0,12 | 0,88 ± 0,12 | 1,45 ± 0,29 | 1,38 ± 0,31 |
| P ( B(A)P ) | ♂ | 1,40 ± 0,33 | 1,19 ± 0,23 | 1,58 ± 0,53 | 1,25 ± 0,21 |
| | ♀ | 1,36 ± 0,21 | 1,21 ± 0,22 | 1,38 ± 0,37 | 1,24 ± 0,26 |
| PH ( B(A)P + HUILE CROTON) | ♂ | 1,15 ± 0,17 | 1,01 ± 0,15 | 1,53 ± 0,35 | 1,31 ± 0,27 |
| | ♀ | 1,19 ± 0,23 | 1,07 ± 0,18 | 1,45 ± 0,34 | 1,40 ± 0,26 |
| H (HUILE DE CROTON ) | ♂ | 1,04 ± 0,14 | 0,95 ± 0,14 | 1,48 ± 0,28 | 1,41 ± 0,32 |
| | ♀ | 1,08 ± 0,25 | 0,98 ± 0,11 | 1,48 ± 0,21 | 1,34 ± 0,28 |
| C ( BENZA-CRIDINE ) | ♂ | 1,06 ± 0,13 | 0,99 ± 0,14 | 1,50 ± 0,29 | 1,41 ± 0,21 |
| | ♀ | 1,04 ± 0,10 | 1,00 ± 0,14 | 1,49 ± 0,24 | 1,34 ± 0,26 |

Tableau IV.2.: Dosages histochimiques de la phosphatase alcaline dans la peau de la souris au niveau du derme et du follicule pileux. Les résultats sont exprimés en absorbance (u.a.) par unité de surface colorée: rapport $\frac{A}{S}$ moyen (des valeurs lues sur le Vickers), calculé sur 20 animaux de chaque lot.

* Ecart type.

| LOT | | DERME | | FOLLICULE PILEUX | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | SwE $\frac{A}{S}$ | R 3 $\frac{A}{S}$ | SwE $\frac{A}{S}$ | R 3 $\frac{A}{S}$ |
| R (RASAGE) | ♂ | 1,23 ± 0,17* | 1,23 ± 0,21 | 1,02 ± 0,29 | 1,01 ± 0,22 |
| | ♀ | 1,30 ± 0,18 | 1,13 ± 0,25 | 1,05 ± 0,27 | 1,01 ± 0,28 |
| T (ACÉTONE) | ♂ | 1,26 ± 0,19 | 1,19 ± 0,26 | 1,06 ± 0,31 | 0,96 ± 0,25 |
| | ♀ | 1,19 ± 0,23 | 1,16 ± 0,19 | 1,03 ± 0,31 | 1,01 ± 0,32 |
| P (B(A)P) | ♂ | 1,32 ± 0,27 | 1,26 ± 0,32 | 1,77 ± 0,60 | 1,34 ± 0,42 |
| | ♀ | 1,44 ± 0,37 | 1,31 ± 0,31 | 1,66 ± 0,62 | 1,43 ± 0,55 |
| PH (B(A)P + HUILE CROTON) | ♂ | 1,34 ± 0,21 | 1,29 ± 0,20 | 1,52 ± 0,46 | 1,32 ± 0,30 |
| | ♀ | 1,32 ± 0,25 | 1,30 ± 0,25 | 1,34 ± 0,38 | 1,20 ± 0,37 |
| H ( HUILE DE CROTON ) | ♂ | 1,44 ± 0,27 | 1,18 ± 0,18 | 1,27 ± 0,40 | 1,08 ± 0,19 |
| | ♀ | 1,31 ± 0,32 | 1,28 ± 0,25 | 1,17 ± 0,40 | 0,93 ± 0,17 |
| C ( BENZA-CRIDINE ) | ♂ | 1,43 ± 0,25 | 1,27 ± 0,28 | 1,21 ± 0,33 | 1,12 ± 0,36 |
| | ♀ | 1,23 ± 0,24 | 1,19 ± 0,33 | 1,13 ± 0,41 | 1,10 ± 0,38 |

Tableau IV. 3.: Conclusions de l'analyse statistique effectuée pour le dosage de la phosphatase acide.

Comparaisons des divers traitements ainsi que des souches et sexes entre-eux.

Abréviations: voir tableau III. 3.

| ACTIVITÉ AU NIVEAU DU DERME COMPARAISONS : | F CALCULÉ | F TABLE | P = ··· |
|---|---|---|---|
| ♂ ≡ ♀ * | 3,48<br>1 et 454 DL | 3,86 | 0,05 |
| SwE > R 3 | 32,24<br>1 et 454 DL | 6,70 | 0,01 |
| R ≡ T * | 2,88<br>1 et 118 DL | 3,94 | 0,05 |
| P > PH * | 25,71<br>1 et 115 DL | 6,88 | 0,01 |
| PH > R ou T * | 35,36<br>2 et 176 DL | 4,73 | 0,01 |
| H ≡ C * | 0,172<br>1 et 112 DL | 3,94 | 0,01 |
| H ou C > R ou T * | 20,82<br>1 et 270 DL | 6,72 | 0,01 |
| ACTIVITÉ AU NIVEAU DU FOLLICULE PILEUX COMPARAISONS: | F CALCULÉ | F TABLE | P = ··· |
| ♂SwE ≡ ♀ SwE > ♂R3 ≡ ♀ R3 | 9,54<br>3 et 444 DL | 3,85 | 0,01 |
| R ≡ T ≡ P ≡ PH ≡ H ≡ C * | 1,68 | 2,03 | 0,05 |

* Les analyses concernent les souches SwE et R3

Tableau IV. 4.: Conclusions de l'analyse statistique effectuée pour le dosage de la phosphatase alcaline.

Comparaisons des divers traitements ainsi que des souches et des sexes entre-eux. Abréviations : voir tableau III.3.

| ACTIVITÉ AU NIVEAU DU FOLLICULE PILEUX COMPARAISON : | F CALCULÉ | F TABLE | P = .... |
|---|---|---|---|
| ♂ ≡ ♀ * | 0,270<br>1 et 452 DL | 6,70 | 0,01 |
| SwE > R3 | 15,80<br>1 et 452 DL | 6,70 | 0,01 |
| R ≡ T * | 0,03<br>1 et 116 DL | 3,93 | 0,05 |
| P > PH * | 8,78<br>1 et 115 DL | 6,90 | 0,01 |
| PH > R ou T* | 36,25<br>2 et 174 DL | 4,75 | 0,01 |
| H ≡ C * | 0,65<br>1 et 113 DL | 3,93 | 0,05 |
| H ou C > R ou T * | 4,49<br>3 et 229 DL | 3,88 | 0,01 |
| ACTIVITÉ AU NIVEAU DU DERME. COMPARAISON : | F CALCULÉ | F TABLE | P = .... |
| ♂ SwE ≡ ♀ SwE ≡ ♂ R3 ≡ ♀ R3 | 2,62<br>3 et 440 DL | 3,06 | 0,01 |
| R ≡ T ≡ P ≡ PH ≡ H ≡ C * | 2,52<br>3 et 440 DL | 3,02 | 0,01 |

* Ces analyses concernent les souches SwE et R3

Compte tenu des erreurs dues à la confection des coupes, à la coloration, à l'appareil de mesure, et vu que nous travaillons avec des animaux de souche pure, nous pouvons admettre que les souris d'un même lot ont, au niveau de leur peau, des activités phosphatasiques semblables.

1.2.2. Variations sexuelles

L'analyse de variance globale faite en fonction des sexes, pour les deux souches de souris traitées ou non, montre que l'activité phosphatasique tant acide qu' alcaline de la peau n'est pas fonction du sexe (Tableaux IV.3. et IV.4.).

1.2.3. Variations raciales

Une différence raciale faible, mise en évidence par l'analyse statistique, existe tant au niveau du derme que du follicule pileux pour la phosphatase acide, mais uniquement au niveau du follicule pileux pour la phosphatase alcaline. La souche SwE a en moyenne une peau dont l'activité phosphatasique globale est plus élevée que la souche R3 (Tableaux IV.3. et IV.4.).

## 2. CONSEQUENCE DU TRAITEMENT A L'ACETONE

L'effet du traitement à l'acétone est nul sur l'activité des deux types de phosphatases, ce qui confirme l'innocuité de ce solvant et le bien fondé de son emploi comme véhicule des cancérigènes et co-cancérigènes.

## 3. MODIFICATIONS DE L'ACTIVITE PHOSPHATASIQUE EN FONCTION DE LA CANCERISATION

### 3.1. Action du benzo(a)pyrène

Ce cancérigène fort entraîne une augmentation

précoce (3$^{e}$ badigeonnage) et significative de l'activité phosphatasique acide dans le derme uniquement de nos deux souches de souris (Tableau IV.3. et Figure IV.3.). Ce phénomène fréquent lors de l'apparition du cancer ( 4 )( 30 )(106) sera discuté par la suite.

L'activité phosphatasique alcaline est modifiée au niveau du follicule pileux, alors que l'activité dermique ne l'est pas. Il s'agit en réalité d'une forte augmentation de l'activité enzymatique dans la couche conjonctive entourant la base du follicule, qui est présent dès le 3$^{e}$ badigeonnage (Figure IV.4.,lot P).

### 3.2. Action de la 3,4-benzacridine

Les augmentations statistiquement significatives des activités enzymatiques (Tableaux IV.3. et IV.4., lot C) au niveau du derme pour la phosphatase acide, du follicule pileux pour la phosphatase alcaline, ne sont en réalité que légères par rapport aux activités de la peau des animaux non traités (lot R)(Figures IV.3. et IV.4., lot C). Elles semblent correspondre au pouvoir cancérigène très faible de ce composé, que nous avons considéré, en vertu du temps de traitement court, comme un initiateur seulement.

## 4. PHENOMENE DE COCANCERISATION

### 4.1. Influence d'un cocancérigène seul (Huile de croton)

Les modifications de l'activité de nos enzymes dues au traitement par l'huile de croton seule, sont identiques à celles que l'on obtient à la suite d'un traitement à la 3,4 -benzacridine (Tableaux IV.3. et IV.4., lots H et C)(Figures IV.3. et IV.4., lot H). Il en découle que les phénomènes d'initiation et de promotion que nous avons induits, ont une action comparable sur nos phosphatases.

Figure IV.3 : Mise en évidence des modifications précoces de l'activité phosphatasique acide dermique au cours des badigeonnages et en fonction des traitements.
$\overline{R}$ = activité enzymatique moyenne (et sa dispersion) du derme des animaux non traités (R).
o——o souche SwE
o----o souche R3

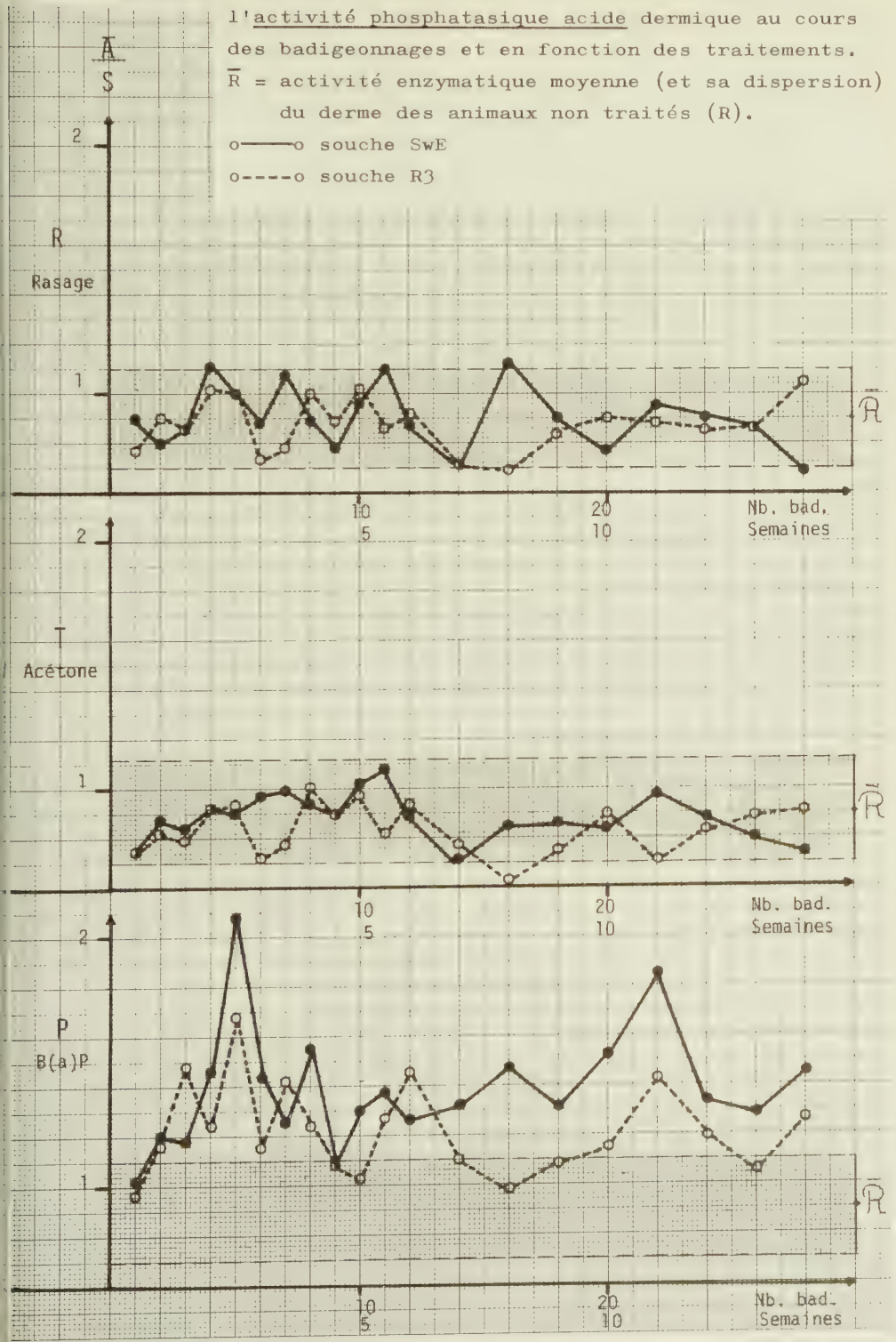


Figure IV.3 : Suite

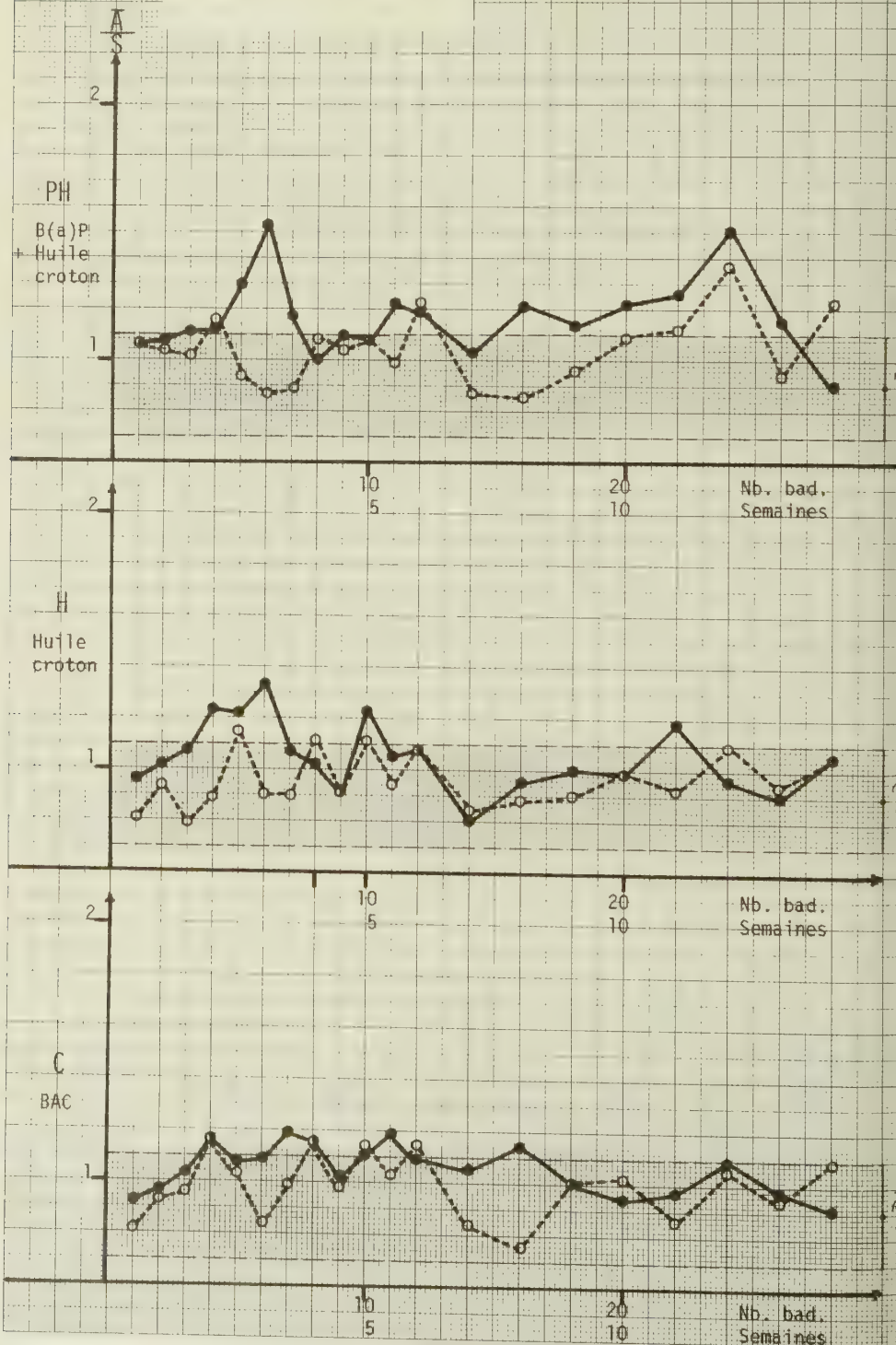
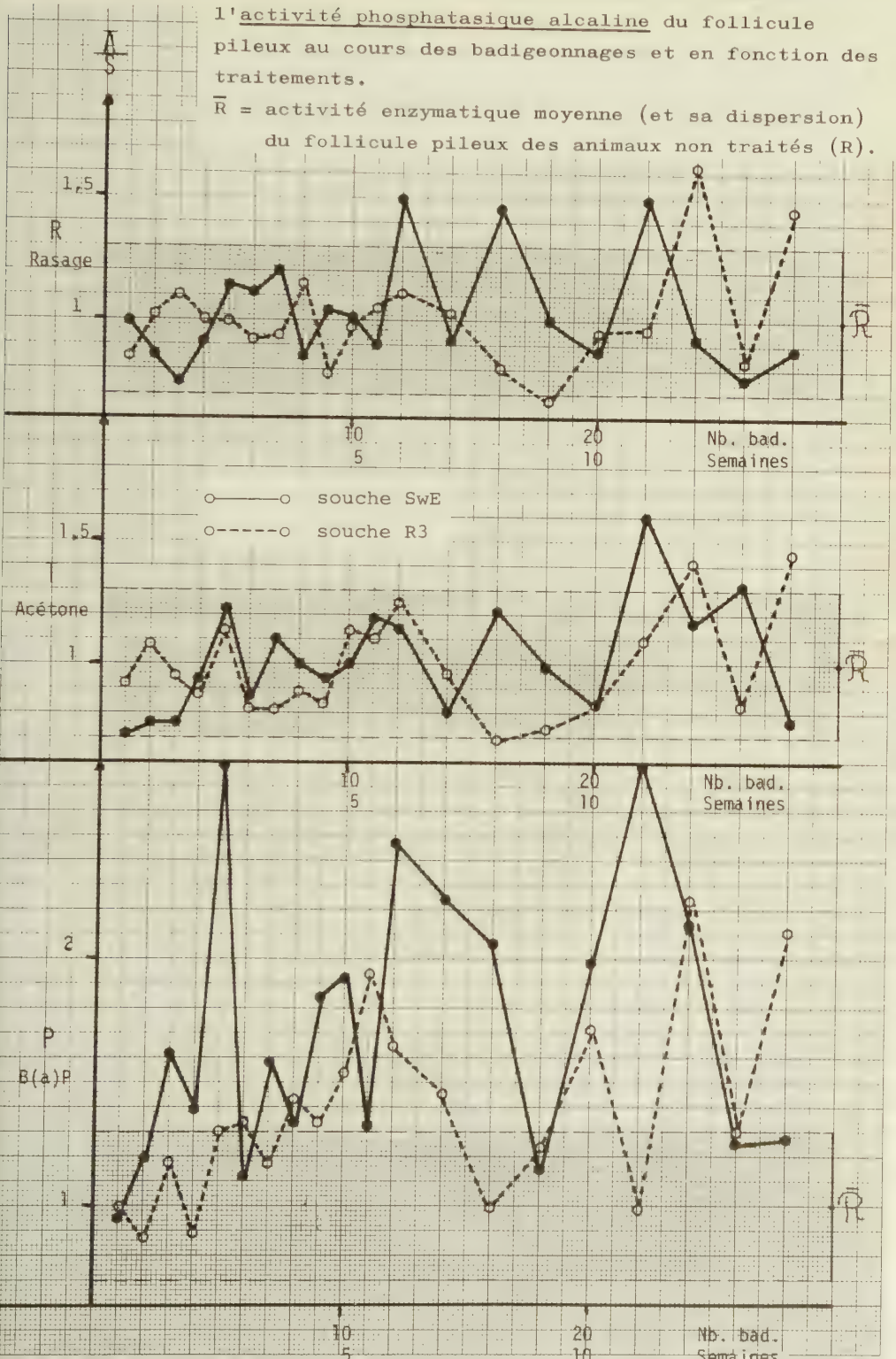


Figure IV.4 : Mise en évidence des modifications précoces de l'activité phosphatasique alcaline du follicule pileux au cours des badigeonnages et en fonction des traitements.

$\overline{R}$ = activité enzymatique moyenne (et sa dispersion) du follicule pileux des animaux non traités (R).



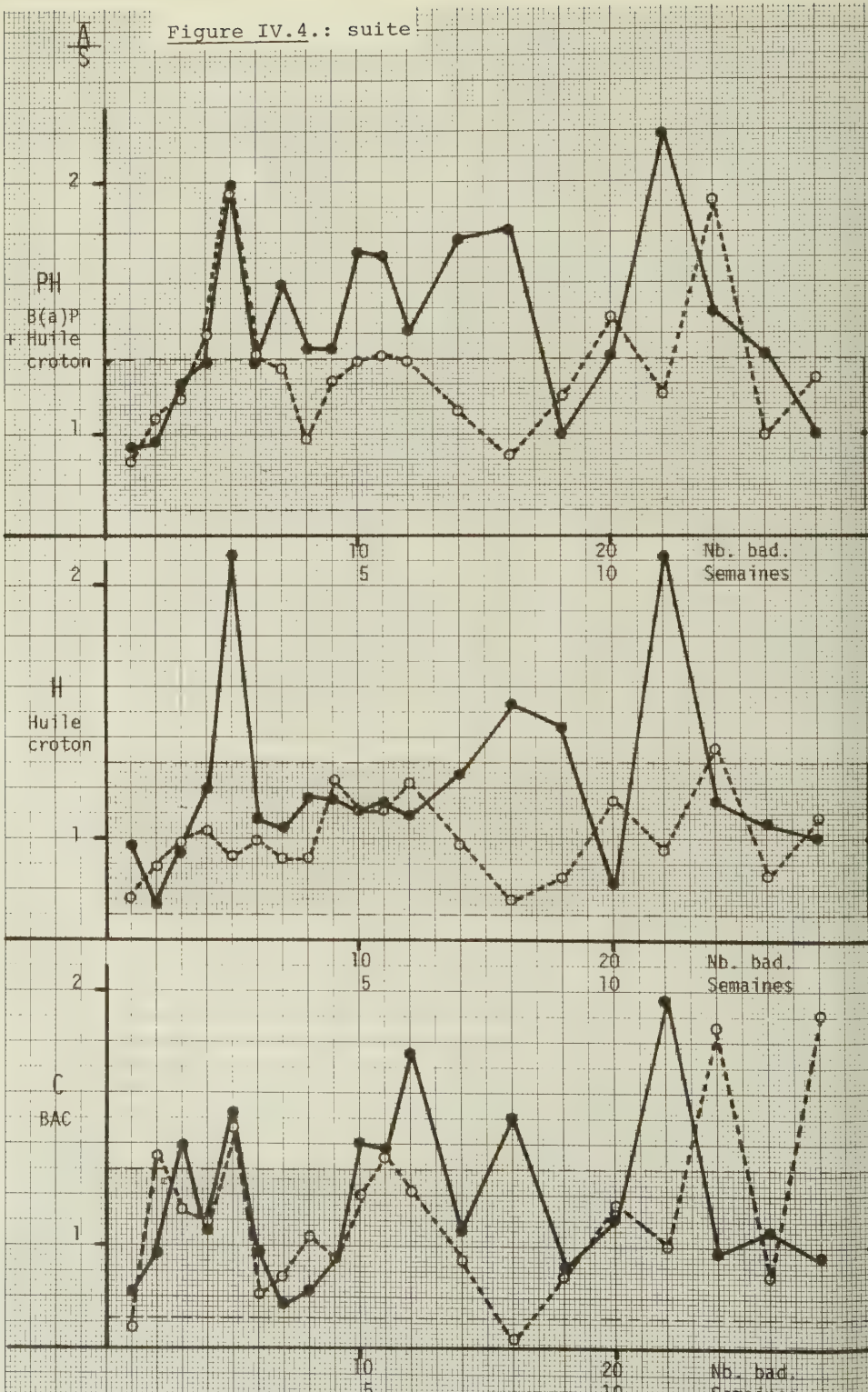



Figure IV.4.: suite

4.2. Effets combinés d'un cancérigène et d'un cocancérigène

L'administration simultanée d'un cancérigène fort et de l'huile de croton à la peau de nos souris a un effet plus faible, mais similaire, sur les activités phosphatasiques que l'administration continue de benzo(a)pyrène (Tableaux IV.3. et IV.4., Figures IV.3. et IV.4., lot PH). L'intensité des modifications de l'activité des deux enzymes étudiées semble être fonction du pouvoir cancérigène du composé administré. Nous reconsidérerons ce problème dans la discussion.

## 5. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Bien que l'on sache déjà que la phosphatase alcaline (ou plutôt de la famille d'enzymes à activité phosphatasique alcaline)* joue un rôle dans la calcification des os, le transport du phosphate au travers des membranes cellulaires, la synthèse des protéines, le métabolisme des nucléoprotéines et des nucléotides, qu'elle peut contrôler la synthèse du DNA et la croissance (100), la fonction exacte de cette enzyme dans le métabolisme reste encore obscure (revue de littérature (123)). Le rôle physiologique de son homologue acide n'est pas mieux connu. Ce groupe d'enzymes localisé principalement dans les lysosomes est nécessairement en étroite relation avec les fonctions connues de ces organites (autolyse, phagocytose, pinocytose, phénomènes immunitaires ).

De nombreux auteurs mettent en évidence une augmentation de l'activité phosphatasique acide des tissus précancéreux, que ce soit au niveau de la peau ( 30 )(106), du foie ( 4 ), de fibroblastes ( 23 ), ou de macrophages ( 72 ). Cette augmentation nette et précoce qui est confirmée par nos résultats, semble se produire au niveau de la peau, dans le derme situé directement sous l'épiderme, principalement dans les mastocytes. Or Wozniak et Wranicz

* Voir note chapitre I. sous 3.5.1.

en 1968 (127), ainsi que Csaba et Forgacs en 1969(22) en observant la présence massive de ces cellules dans le derme de la peau précancéreuse émirent l'hypothèse que ces cellules riches en histamine, en sérotonine et en enzymes prennent part au métabolisme local induit par la transformation cancéreuse. Une étude de la peau de la souris badigeonnée avec du méthylcholanthrène, faite par Tarin (117)(118) en microscopie électronique confirme cette hypothèse : Dans la peau normale de la souris, l'épiderme formé de 2-3 couches de cellules est séparé du derme par une fine couche amorphe, la membrane basale, rattachée aux cellules épidermiques par des hémidesmosomes. A la suite du traitement au méthylcholanthrène, soit au moment de la chute des poils, l'épiderme épaissi montre des cellules séparées par un espace intercellulaire agrandi dont les mitochondries sont riches en corps denses et ronds. Le tissu conjonctif superficiel voit diminuer la taille de ses fibres conjonctives et augmenter sa substance intersticielle . La population cellulaire dermique s'accroît, les nouvelles cellules étant des mastocytes principalement. La jonction dermo-épidermique montre alors une membrane basale épaisse qui, n'étant plus rattachée aux cellules de l'épiderme par des hémidesmosomes, s'en sépare et crée de petits espaces remplis de matériel fibrillaire , granulaire et parfois de vésicules. En poursuivant les badigeonnages, au stade de la régénération des poils, des lacunes apparaissent dans la membrane basale, et des débris - supposés provenir de cette membrane - sont observés dans le derme. Ces débris paraissent se réunir dans les zones proches des mastocytes créant un dédoublement de la membrane basale. Lors de l'apparition des papillomes, les cellules épidermiques basales poussent des pseudopodes dans le conjonctif. Ces projections s'étranglent et donnent des vésicules libres à la surface du derme. Elles se rompent par la suite et leur

contenu semble détruire le tissu conjonctif avoisinant, permettant aux cellules épidermiques de s'infiltrer dans cette zone. La jonction dermo-épidermique des épithéliomas présente des modifications analogues mais plus prononcées : la membrane basale est absente, l'activité vésiculaire des cellules basales est forte, le tissu conjonctif avoisinant est désorganisé. L'auteur constate de plus que les substances irritantes telles que le benzène ou la térébenthine ne modifient en aucune façon la jonction dermo-épidermique et conclut que le processus décrit est spécifique de la carcinogénèse.

Nous pouvons admettre que si la destruction de la membrane basale est un processus important et spécifique de la cancérisation, les mastocytes qui sont riches en phosphatase acide, jouent un rôle prédominant lors de cette destruction.La présence de ces enzymes en grande quantité dans le derme, telle que nous l'avons observée, serait alors spécifique de la transformation cancéreuse, d'autant plus qu'il semble qu'une relation existe entre le pouvoir cancérigène de la substance administrée et l'activité phosphatasique acide du derme traité (Figure IV.5.).

Il ressort des études faites sur la peau de l'homme et celle de la souris, que leur activité phosphatasique alcaline n'est pas modifiée spécifiquement par la cancérisation ( 9 )( 55)( 75)( 90). En effet, une augmentation s'observe très généralement dans les sites de haute activité métabolique de la peau normale et pathologique. Les modifications précoces de cette enzyme à la base du follicule pileux que nous avons obtenues lors des divers traitements, pourraient donc être mises en relation avec les processus de régénération des poils qui se produisent après les premiers badigeonnages, sans que toutefois ce mécanisme n'ait de rôle spécifique dans le phénomène de cancérisation auquel le follicule pileux ne semble du reste pas participer (117)(118).

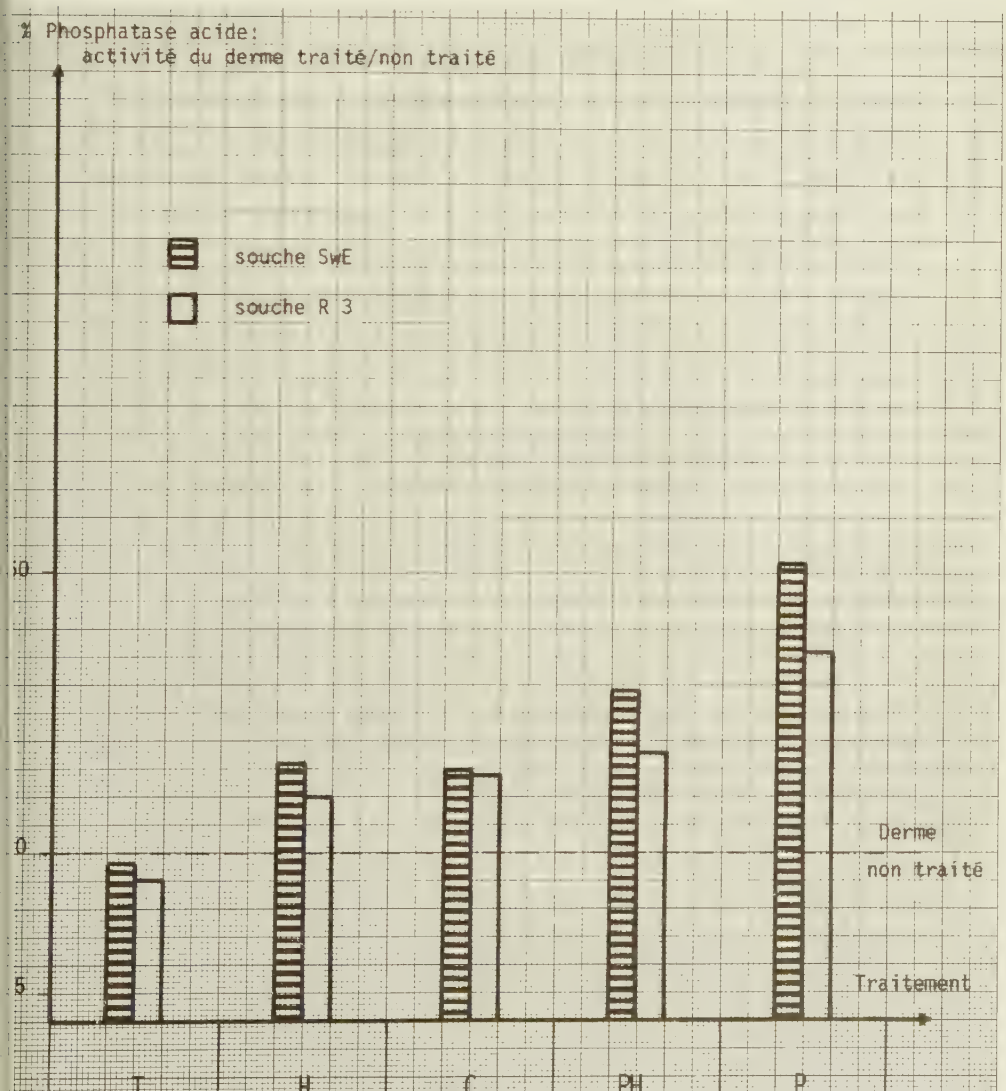
En conclusion :

Le traitement de la peau de la souris par diverses substances cancérigènes entraîne :

1. Une augmentation précoce de l'activité phosphatasique acide localisée principalement dans les mastocytes du derme situé directement sous l'épiderme. Cette réaction semble spécifique de la transformation cancéreuse, étant donné le rôle prépondérant joué par les mastocytes lors de la destruction de la membrane basale de la jonction dermo-épidermique, entraînant l'infiltration de l'épiderme dans le derme (117)(118).

2. Une augmentation précoce de l'activité phosphatasique alcaline au niveau du tissu conjonctif entourant la base du follicule pileux. Cet accroissement d'activité ne semble pas être spécifique de la cancérisation, mais dépendre plutôt d'une augmentation de l'activité métabolique du poil lors de sa régénération ( 55 ).

Figure IV.5.: Etude de l'augmentation (% de l'activité enzymatique de la peau des animaux non traités ) de l'activité phosphatasique acide du derme traité en fonction du pouvoir cancérigène des substances administrées. Ce pouvoir a été estimé nul pour l'acétone (T), très faible pour l'huile de croton (H) et pour la benzacridine (C), moyen pour le B(a)P suivi de l'huile de croton (PH) et fort pour le B(a)P (P) en fonction du nombre des papillomes et des épithéliomas observés.



## Discussion générale

### 1. CRITERE HISTOCHIMIQUE PRECOCE DE CANCERISATION

Après avoir essayé d'établir l'existence d'une relation spécifique entre le processus biologique de cancérisation et certaines modifications biochimiques précoces qui pouvaient se produire au cours de son évolution, nous pouvons faire les quelques commentaires suivants:

Si l'augmentation significative du DNA comme la diminution des histones riches en lysine, lors des phénomènes de cancérisation est très nette et indiscutable, il reste à savoir si ces modifications apparaissent uniquement lors de l'induction du cancer ou sont le reflet d'un processus à la fois général et moins spécifique tel que la prolifération cellulaire.

Or il est connu que des organes normaux, en régénération ou à index mitotique élevé possèdent une famille de noyaux tetraploïde ou préprophasique nouvelle, ainsi que des noyaux diploïdes plus riches en DNA-Feulgen que ceux à faible activité mitotique ( 37 )( 38 ). Ce processus qui est celui que nous observons dans la peau de nos souris en voie de cancérisation est donc lié à la multiplication des cellules épidermiques et non pas à la transformation cancéreuse. D'autre part,en fonction des théories chimiques de la carcinogénèse (101) évoquées déjà dans notre avant-propos, nous pouvons supposer que l'action des agents alkylants ou des hydrocarbures polycycliques consisterait à provoquer une mutation ponctuelle du DNA au niveau de la guanine. Si la transformation maligne de la cellule est liée à ce phénomène, il est évident qu'un dosage global du DNA par nos méthodes histochimiques ne peut pas mettre en évidence de si petites modifications.

Le peu de connaissances que nous avons de la fonction des histones et tout particulièrement des histones riches en lysine qui ont la propriété de se lier moins facilement au DNA que les histones riches en arginine (110) ne nous permet pas de conclure que les modifications de ces substances soient dues aux mécanismes de cancérisation plutôt qu'à ceux de prolifération uniquement. Il serait nécessaire de répéter toute notre expérience avec des substances irritantes telles que le benzène, la térébenthine ou l'acide acétique, ainsi que dans le cas de blessures ou de brûlures, pour contrôler cette relation.

Le même problème se pose en ce qui concerne la spécificité de l'augmentation massive de l'activité phosphatasique acide du derme traité au benzo(a)pyrène ou à d'autres cancérigènes. La connaissance des processus métaboliques, dans lesquels est impliquée la phosphatase acide, est limitée à ce que nous savons des lysosomes. Cependant, le fait que cette activité soit constatée dans les mastocytes et que ces derniers soient nettement augmentés en cas de cancer ou de précancer ajoute un élément intéressant à notre discussion (22)(127). En effet, ces cellules dont le rôle physiologique est mal connu sont également riches en mucopolysaccharides acides, en histamine et en héparine (22). Elles proviendraient de la transformation de cellules apparemment non différenciées se trouvant dans la région dermo-épidermique de la zone de traitement et joueraient un rôle de barrière contre l'invasion du derme par l'épiderme. Ce mécanisme est confirmé par le travail de Tarin (117) lorsqu'il met en évidence le processus de reconstruction par les mastocytes de la membrane basale endommagée par les cancérigénes. Wozniak et Wranicz (127) étudièrent la présence de ces éléments dans la région dermo-épidermique de peaux normales et pathologiques. Ils constatèrent que la peau normale contient la même quantité de mastocytes que la peau porteuse de dermatoses, que leur nombre est

doublé dans le cas des papillomes ou des kératoacanthomes et que dans les lésions précancéreuses et dans les épithéliomas, ce nombre est triplé, voire quadruplé. Il semble donc qu'il existe une relation entre la présence massive des mastocytes dans le derme et la formation du cancer. Cette relation pourrait faire l'objet d'un test précoce de cancérisation par l'intermédiaire de l'étude de l'activité phosphatasique acide et éventuellement de celle des mucopolysaccharides acides du derme, à condition de vérifier préalablement que ces deux substances ne sont pas modifiées lors de traitements avec des composés chimiques irritants non cancérigènes et dans le cas de blessures ou de brûlures.

## 2. RELATION HISTOCHIMIQUE ENTRE LA NEOPLASIE EPIDERMIQUE DU TRITON ET CELLE DE LA SOURIS

L'étude histochimique et caryométrique de la néoplasie expérimentale de l'épiderme du triton faite par Marti (70) montre que l'injection de méthylcholanthrène implique une augmentation nette de l'index mitotique des cellules préprophasiques ainsi qu'une augmentation de la teneur en DNA des noyaux interphasiques. Ces résultats sont entièrement parallèles à ceux que nous observons dans la peau de souris traitée au benzo(a)pyrène. Cependant, même si l'épiderme du triton réagit comme celui de la souris en ce qui concerne le DNA, nous ne pouvons toutefois pas conclure que la néoplasie du triton soit réellement une réaction maligne, puisque ces phénomènes histochimiques ne dépendent pas spécifiquement de la cancérisation. Il serait donc nécessaire d'étudier dans la peau de cet animal d'autres substances telles que les histones, les phosphatases ou les mucopolysaccharides.

L'observation en microscopie électronique de l'épiderme du triton normal et traité au méthylcholanthrène qui a été faite par Pillaï en 1962 (89)peut être mise en parallèle avec celle de Tarin (117) en 1967 sur la souris.

La peau normale du triton montre une jonction dermo-épidermique très comparable à la souris. Les cellules basales de l'épiderme sont reliées à ce que Pillaï appelle la membrane adépidermique (qui correspond à la membrane basale) par des "filaments" qui sont très semblables aux hémidesmosomes décrits par Tarin . Le plasmalemme des cellules basales situé face au derme présente en outre une forte activité pinocytique. Dans les tissus traités au méthylcholanthrène, Pillaï constate un élargissement des espaces intercellulaires, particulièrement au niveau de la couche basale. Les desmosomes sont moins nombreux, plus étroits et plus longs. Certaines cellules dégénèrent alors que d'autres deviennent plus sombres et semblent prêtes à se diviser. La jonction dermo-épidermique n'est malheureusement pas étudiée, cependant, l'auteur constate que les cellules basales émettent un grand nombre de vésicules et que dans les espaces intercellulaires riches en ces éléments, le plasmalemme de la cellule la plus proche présente de petites lacunes comme s'il avait été digéré en plusieurs points. La couche basale de l'épiderme du triton sous l'influence d'un cancérigène semble donc se comporter de façon très comparable à celle de la souris et il serait intéressant de vérifier si les modifications de la membrane basale et le comportement des mastocytes de cet animal, sont entièrement ou partiellement comparables au cas de la jonction dermo-épidermique chez la souris, ce qui contribuerait à valoriser plus encore le "Test triton" comme test rapide de cancérisation pour certaines catégories de substances cancérigènes.

## Conclusions

Grâce à l'emploi de méthodes histochimiques quantitatives l'étude des modifications précoces du DNA, des histones et des phosphatases dans la peau de la souris badigeonnée par différentes substances chimiques cancérigènes ou non en vue de l'élaboration d'un test "biochimique" rapide de cancérisation, nous permet de conclure que :

1. Le badigeonnage répété de la peau de nos deux souches de souris SwE et R3 par un cancérigène fort tel que le benzo(a)pyrène, entraîne l'apparition d'épithéliomas avec une latence de 6 à 14 semaines, notre souche Swiss étant plus sensible que la souche Française. L'étude parallèle de l'index mitotique de l'épiderme montre que ce phénomène s'accompagne d'une forte prolifération cellulaire, comparable à celle que Marti (70) observe dans la peau du triton traitée au méthylcholanthrène.

2. Si l'épiderme normal de souris possède des noyaux interphasiques diploïdes "a", dont la teneur moyenne en DNA (Feulgen) est stable entre les individus d'une même souche, mais variable d'une souche à l'autre, l'application d'un cancérigène fort entraîne rapidement l'apparition d'une classe nouvelle de noyaux préprophasiques "b"contenant 1,8 fois le taux en DNA des noyaux "a". Cette famille est induite chez les animaux de nos deux souches à la suite d'un traitement par un cancérigène fort, alors qu'elle n'est présente que dans la souche Swiss (plus sensible) lors de l'application d'un cancérigène plus faible. Nous observons de plus, une augmentation intrinsèque du DNA des noyaux diploïdes par un processus de synthèse apparaissant, on le suppose, en dehors de la phase S du cycle de division. Marti (70) observe les mêmes phénomènes au niveau de l'épiderme du triton en voie de cancérisation.

3. La diminution nette des histones riches en lysine mise en évidence par le Biebrich scarlet dans les noyaux épidermiques et qui apparaît lors des phénomènes de cancérisation, de cocancérisation, d'initiation et de promotion est peut-être responsable de l'accélération de la synthèse du DNA.

4. L'activité phosphatasique acide est augmentée au niveau du derme en voie de cancérisation. Les modifications précoces de cette enzyme, localisée principalement dans les mastocytes semble être en étroite relation avec le développement local de l'épiderme cancéreux. En effet, lors de la destruction de la membrane basale qui assure normalement la jonction dermo-épidermique, les mastocytes paraissent jouer un rôle prépondérant dans la réalisation de l'infiltration de l'épiderme dans le derme.

5. L'augmentation précoce de l'activité phosphatasique alcaline que l'on constate dans la peau en voie de cancérisation, en l'occurence dans le tissu conjonctif entourant le follicule pileux, semble être due à l'augmentation de l'activité métabolique du poil lors de sa régénération; ce phénomène ne serait donc pas directement lié au phénomène de cancérisation.

En somme, aucun critère histochimique quantitatif ou qualitatif précoce de cancérisation de la peau de la souris, en vue de son utilisation comme test rapide n'a pu être trouvé dans ce travail. Seules la diminution des histones des noyaux de la couche basale de l'épiderme et l'augmentation de l'activité phosphatasique acide du derme pourraient peut-être contribuer à la réalisation d'un test rapide de cancérisation, mais ceci à la condition préalable que ces deux substances ne soient pas modifiées par un traitement par un irritant non cancérigène, ce qu'il faudrait encore vérifier.

## Références

( 1 ) Alfert M. and Geschwind I.I. - A selective staining method for basic proteins of cell nuclei. - Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 1953, 39 (991-999).

( 2 ) Alfert M. and Swift H. - Nuclear DNA constancy: a critical evaluation of some exeptions reported by Lison ans Pasteels. - Exp. Cell Research 1953, 5 (455-460).

( 3 ) Altman F.P. - Quantitation in histochemistry: a review of some commercially available microdensitometers.- Histochem. J. 1975, 7 (375-395).

( 4 ) Astashova E.A. - Electron histochemical study of lysosomes in experimental hepatomas with various degrees of differentiation. - Byull. Eksper. Biol. Med. 1972, 74/10 (81-85).

( 5 ) Ball J.K., Huh T.Y. and Mccarter J.A.- On the statistical distribution of epidermal papillomata in mice.- Brit. J. Cancer 1964, 18 (120-123).

( 6 ) Barka T. and Anderson P.J. - Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosaniline as coupler.- J. Histochem. Cytochem. 1962, 10 (741-753).

( 7 ) Berenblum I. - The mecanism of carcinogenesis. A study of the significance of cocarcinogenic action and related phenomena. - Cancer Research 1941, 1 (807-814).

( 8 ) Bern A.H. and Nandi S. - Recent studies of the hormonal influence in mouse mammary tumorigenesis. - Progress in Exp. Tum. Res. 1961, II (91-140).

( 9 ) Biesele J.J. and Biesele M.M. - Alkaline phosphatase in mouse skin under methylcholanthrene treatment. - Cancer Research 1944, 4 (751-755).

( 10 ) Bloch D.P. and Godman G.C. - A microphotometric study of the synthesis of DNA and nuclear histone. - J. Biophys. and Cytol. 1955, 1/1 (19-28).

( 11 ) Bloch D.P. and Hew H:Y:C: - Changes in nuclear histones during fertilization and early embryonic development in the pulmonate snail, Helix Aspersa. - J. Biophys. Biochem. Cytol. 1960, 8 (69-81).

( 12 ) Brookes P. and Lawley P.D. - The reaction of mono- and difonctional alkylating agents with nucleic acids.- Biochem. J. 1961, 80 (496-503).

( 13 ) Brookes P. and Lawley P.D. - Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin: relation between carcinogenic power of hydrocarbons and their binding to deoxyribonucleic acid. - Nature (Lond.) 1964, 202/4934 (781-784).

( 14 ) Bryan W.R. and Shimkin M.B. - Quantitative analysis of dose-response data obtained with carcinogenic hydrocarbons. - J. Natl. Cancer Inst. 1941, 1 (807-833).

( 15 ) Busch H. and Steele W.J. - Nuclear proteins of neoplasic cells. - Advances in Cancer Res., Haddow A. and Weinhouse S. 1964, 8 (42-112).

( 16 ) Caputo A. - Types of DNA syntesis in cancer cells. - Rev. Europ. Etud. Clin. Biol. 1972, 27/3 (249-253).

( 17 ) Carnow B. and Meier P. - Air polution and pulmonary cancer . - Arch. Environ, Hlth 1973, 27 (207-218).

( 18 ) Caspersson T. - Uber die chemische Aufbau der Structuren des Zellkerns. - Skand. Arch. Physiol. 1936, suppl. 8 (1-151).

( 19 ) Cioli V., Scorza B.P. and Silvestrini B. - Study of the potential carcinogenicity of topical drug. Suggestions for new experimental approach. - Exp. Molec. Pathol. 1971, 15/1 (1-20).

( 20 ) Coodley E.L. - Diagnostic enzymology. - Ed. Lea and Febiger, Philadelphia, Pennsylvania 1970.

( 21 ) Cowden R.R. anc Curtis S.K. - A comparison of four quantitative cytochemical methods directed toward demonstration of DNA. - Histochemistry 1975, 45/4 (299-308).

( 22 ) Csaba G. and Forgacs A. - Behaviour of mast cells in the skin of mice treated with benzpyrene. - Acta Morph. Acad. Sci. Hung. 1970, 18/1 (17-22).

( 23 ) Dawson A.L., Beadle D.J., Livingstone D.C. and Fisher S.W. - A histochemical study of acid phosphatase in normal and virus-transformed cultured fibroblasts. - Histochem. J. 1975, 7/1 (77-84).

( 24 ) Day T.D. - Carcinogenic action of cigarette smoke condensate on mouse skin. An attempt at a quantitative study. - Brit. J. Cancer 1967, 21 (56-81).

( 25 ) Deeley E.M. - An integrating microdensitometer for biological cells. - J. Sci. Instrum. 1955, 32 (263-267).

( 26 ) Deitch A.D. - A cytophotometric method for estimation of histone and non-histone protein. - J. Histochem. Cytochem. 1965, 13 (17-18).

( 27 ) Della Porta G. and Terracini B. - Chemical carcinogenesis in infant animals. - Progress in Exp. Tum. Res. 1969, II (334-363).

( 28 ) Derout J., Thierot-Prevost G. and de Brux J. - Influence of mâle hormone on chemical carcinogenesis in mouse skin. - C.R. Soc. Biol. (Paris) 1971, 165/3 (520-523).

( 29 ) Desai L.S. and Foley G.E. - Human leukemic cells. Cytochemical studies on acidic nuclear proteins. - J. Histochem. Cytochem. 1974, 22/1 (40-45).

( 30 ) Diengdoh J.V. - Lysosomes in malignant skin tumours. - Nature (Lond.) 1967, 215/5103 (861-862).

( 31 ) Dieter P. - Effects of carcinogenic, non carcinogenic and co-carcinogenic agents on the biosynthesis of nucleic acids in mouse skin. - Cancer Res. 1969, 29 (1218-1225).

( 32 ) Dipple A., Lawley P.D. and Brookes P. - Theory of tumour initiation by chemical carcinogen : dependence of activity on structure of ultimate carcinogen. - Eur. J. Cancer 1968, 4 (493-506).

( 33 ) Dontenwill W., Elmenhorst H., Harke H.P., Reckzeh G. and Weber K.H. - Experimentelle Untersuchungen über die tumorerzeugende Wirkung von Zigarettenrauch Kondensaten an der Mäusehaut. Z. Krebsforsh. 1970, 73 (285-304).

( 34 ) Du Bois A.M. - Précis de technique histologique. - Institut d'histologie normale et d'embryologie générale, Genève 1966.

( 35 ) Ehlers G. and Herbstreit I. - Cytophotometric investigations on the DNA and the nucleohistone contents of various differentiating squamous cell carcinoma of the skin and transitional mucous membrane. - Arch. Derm. Forsch. 1973, 247/2 (125-144).

( 36 ) Fand S.B. - Environmental conditions for optimal Feulgen hydrolysis. - Introduction to quantitative Histochemistry II, ed. Wied G.L. and Bahr G.F., 1970.

( 37 ) Fautrez J. - Le dynamisme des acides nucléiques. - Gauthier-Villars, Paris 1966.

( 38 ) Fautrez J. - Variation de la teneur en ADN des noyaux interphasiques en fonction de l'activité cellulaire et leur relation avec les variations du volume nucléaire. - Handbuch der Histochemie, Band III, Nucleinsäuren, 3. Teil, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1966, (54-115).

( 39 ) Gahrton G., Habicht W. and Wahren B. - A quantitative cytochemical investigation of DNA, RNA and protein in lymphoïd cells from normal, preleukemic and leukemic mice. Exp. Cell Res. 1966, 42 (218-229).

( 40 ) Garcia A.M. and Iorio R. - Studies on DNA in leukocytes and related cells of mammals. V. The fast-green-histone and Feulgen-DNA content of rat leukocytes. - Acta cytol. 1968, 12/1 (46-51).

( 41 ) Garcia H. and Leiva S. - Relative DNA concentration in mouse epidermis treated with carcinogens or croton oil. - Tumori 1971, 57/3 (129-132).

( 42 ) Glucksmann A., Lamerton L.F. and Mayneord W.V. - Carcinogenic effects of radiation. - Cancer, Ed, Raven 1957, 1 (497-537).

( 43 ) Gomori G. - Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sections. - Proc. Exp. Biol. Med. 1939, 42 (23-26).

( 44 ) Griffith W.G. - Atmospheric pollution and lung cancer. - Cancer Progress, ed. Raven R.W., 1963 (86-93).

( 45 ) Grover P.L. and Sims P. - Interactions of the K-region epoxides of phenanthrene and dibenzanthracene with nucleic acids and histone. - Biochem. Pharmacol. 1970, 19 (2251-2259).

( 46 ) Happert J.L. and Engel J.C. - Le rôle nocif du tabac vu par l'expérimentateur. - Rev. de tuberc. et de pneumol. 1972, 36/2 (208-224).

( 47 ) Hecker E. - Isolation and characterization of the cocarcinogenic principles from croton oil. - Methods in Cancer res., H. Busch 1971, VI (439-507).

( 48 ) Hennings H. and Boutwell R.K. - The inhibition of DNA synthesis by initiators of mouse skin tumorigenesis. - Cancer Res. 1969, 29 (510-514).

( 49 ) Hnilica L.S. - Proteins of the cell nucleus. - Progr. Nucl. Acid Res. Molec. Biol. 1967, 7 (25-106).

( 50 ) Hoch-Ligeti C., Stutzman E., Brown J.T.J. and Al. - Nucleic acids and histone concentration in tumour-free liver of cancer patients. - Cancer (Philad.) 1969, 23/6 (1399-1407).

( 51 ) Holzmann E. - A cytochemical study of the extraction of histones from Necturus liver. - J. Histochem. Cytochem. 1965, 13 (17).

( 52 ) Kasten F.H. - Feulgen reaction - an enigma in cytochemistry. - Acta Histochem. 1964, 17 (88-99).

( 53 ) Kaye C.I. and Nadler H.C. - Characterization of acid phosphatase isoenzymes in human skin fibroblasts. - Enzyme 1976, 21/2 (108-114).

( 54 ) Kennaway E.L. - Further experiments on cancer-producing substances. - Biochem. J. 1930,24 (497-503).

( 55 ) Kopf A.W. - The distribution of alkaline phosphatase in normal and pathologic human skin. - Arch. Derm. 1957,75 (1-37).

( 56 ) Kourilsky R. and Happert J.L. - Comparaisons entre le cancer bronchopulmonaire provoqué chez la souris par le goudron de la fumée de cigarette et le cancer humain. - Bull. Cancer 1964, 51/2 (243-268).

( 57 ) Lavelle S.M. - Action of histone on neoplasic and normal growth. - Irish J. Med. Sci. 1973, 142/2 (58-65).

( 58 ) Lazar P., Chouroulinkov C., libermann C. and Guérin M. - Benzopyrene content and carcinogenicity of cigarette smoke condensate: résults of short-term and long-term tests . - J. Natl. Canc. Inst. 1966, 37 (573-579).

( 59 ) Lee P.N. and Peto R. - The effect of age of mice on the incidence of skin cancer. - Brit. J. Cancer 1970, 24 (849-852).

( 60 ) Leuchtenberger C. - Critical evaluation of Feulgen microspectrophotometry for estimating amount of DNA cell nuclei. - Science 1954, 120 (1022-1023).

( 61 ) Leuchtenberger C. and R. - DNA in tumors and virus infections. - Handbuch der Histochemie, Band III, Nucleinsäuren, 3. Teil, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1966 (1-53).

( 62 ) Leuchtenberger C. and R., and Davis A.M. - A microspectrophotometric study of the desoxyribonucleic acid content in cells of normal and malignant human tissues. - Amer. J. path. 1954, 30 (65-85).

( 63 ) Libermann C., Lazar P., Chouroulinkov I. and Guérin M. - Efficacité des tests courts cutanés pour le classement selon leur pouvoir carcinogène des benzacridines angulaires substituées. - C.R. Soc. Biol. (Paris) 1968, 162/4 (836-838).

( 64 ) Lijinsky W. and Garcia H. - Skin carcinogenesis tests of hydrogenated derivatives of anthanthrene and other polynuclear hydrocarbons. - Zeitschr. Krebsforsch. Klin. Onkol. 1972, 77/3 (226-230).

( 65 ) Lison L. - Histochimie animale, méthodes et problèmes. - Coll. des actualités biologiques, Paris, Gauthier-Villars, 1936.

( 66 ) Lison L. and Valeri V. - L'erreur dans la détermination histophotométrique de l'acide désoxyribonucléique et la variation individuelle des noyaux en acide désoxyribonucléique. - Chromosome 1956, 7 (497-507).

( 67 ) Lison L. - Statistique appliquée à la biologie expérimentale. la planification de l'expérience et l'analyse des résultats. - Paris, Gauthier-Villars, 1968.

( 68 ) Loveless A. - Possible relevance of O-6 alkylation of deoxyguanine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides. - Nature (London) 1969, 223 (206-207).

( 69 ) Marks D.B., Kanefsky T., Keller B.J. and Marks A.D. - The presence of histone $HI^{o}$ in human tissues. - Cancer Res.1975, 35/4 (886-889).

( 70 ) Marti J. - Recherches histophotométriques et caryométriques sur la néoplasie expérimentale de l'épiderme du triton. - Thèse de doctorat de la faculté de médecine de Lausanne, 1973 .

( 71 ) Major I.R. - Correlation of initial changes in the mouse epidermal cell population with two stage carcinogenesis. - A quantitative study. - Brit. J. Cancer 1970, 24/1 (149-163).

( 72 ) Miller K. and Harington J.S. - Some biochemical effects of asbestos on macrophages. - Brit. J. Exp. Path. 1972, 53/4 (397-405).

( 73 ) Mondal S. and Heidelberger C. - In vitro malignant transformation by methylcholanthrene of the progeny of single cells derived from C3H mouse prostate. - Proceed. Natl. Acad. Sci. 1970, 65/1 (219-225).

( 74 ) Moretti G. and Mescon H. - A chemical-histochemical evaluation of acid phosphatase activity in human skin. - J. Histochem. Cytochem. 1956, 4 (247-253).

( 75 ) Moss D.W. - Multiple forms of alkaline phosphatase: Some topics of current interest. - Histochem. J. 1974, 6/4 (53-60).

( 76 ) Muramatsu M. and Busch H. - Isolation, composition and function of nucleoli of tumors and other tissues. - Methods in Cancer Research, H. Busch, 1967, II (303-355).

( 77 ) Noeske K. - Discrepancies between cytophotometric alkaline fast green measurements and nuclear histone protein content. - Histochem. J. 1973, 5 (303-311).

( 78 ) Neukomm S. - Un test sensible et ultra-rapide du pouvoir cancérigène de certaines substances chimiques . - Oncologia 1957, 10 (107-119).

( 79 ) Neukomm S. - The Newt test in relation to investigation on carcinogenic and cocarcinogenic substances. - NCI Monogr. 1962, 9 (71-73).

( 80 ) Neukomm S. - Evaluation of the potential carcinogenic and cocarcinogenic action of drugs. - Oncologia 1965, 19 (239-253).

( 81 ) Neukomm S. - Les cancérigènes dans l'environnement. - Médecine et hygiène 1975, 33 (254-255).

( 82 ) Neukomm S., Boissonnaz A. and Richard M. - Recherches sur l'action du méthylcholanthrène sur des tissus cultivés in vitro. - Acta Anat. 1957, 31 (289-304).

( 83 ) Neukomm S. and Wavre D. - Recherches sur l'action du méthylcholanthrène sur des tissus cultivés in vitro . II. Teneur en ADN des noyaux de fibroblastes traités par l'acétone et le méthylcholanthrène . - Oncologia 1960, 13 (310-319).

( 84 ) Osten W. - Krebsdiagnostik durch das Laboratorium. - Med. Lab. 1970, 23 (221-234).

( 85 ) Pasteels J. and Bullough W.S. - Augmentation expérimentale de la teneur en ADN des noyaux. Action de l'huile de croton sur l'épiderme de l'oreille de souris. - Arch. Biol. (Liège) 1953, 64 (271-294).

( 86 ) Patau K. - Absorption microphotometry of irregular-shaped objects. - Chromosoma 1952, 5 (341-362).

( 87 ) Paul D. and Hecker E. - On the biochemical mechanism of tumorigenesis in mouse skin. II. Early effects on the biosynthesis of nucleic acids by initiating doses of phorbol-12,13-diester TPA. - Zeitschr. für Krebsforsch. 1969, 73 (149-163).

( 88 ) Pearse A.G.E. - Histochemistry, theoretical and applied. - J. and A, Churchill L.T.D. 1968, tomes 1 et 2.

( 89 ) Pillai P.A. - Electron microscopic studies on the epidermis of newt with an enquiry into the problem of induced neoplasia. - Thèse de doctorat de la faculté des sciences de Lausanne 1962.

( 90 ) Pirilä V. and Eränkö O. - Distribution of histochemically demonstrable alkaline phosphatase in normal and pathological human skin. - Acta Path. Microbiol. Scand. 1950, 27 (651-661).

( 91 ) Prentø P. and Lyon H. - Nucleoprotein staining. An analysis of a standardized trichloroacetic acid-fast green F.C.F. procedure. - Histochem. J. 1973, 5 (493-501).

( 92 ) Prestayko A.W. and Busch H. -Isolation of nucleolar proteins. - Methods in Cancer Research, H. Busch, 1973, IX (155-190).

( 93 ) Rapp F.- Viral oncogenesis. - Methods in Cancer Research, H. Busch, 1967, I (451-529).

( 94 ) Roe F.J.C., Carter R.L., Mitchley B.C.V., Peto R. and Hecker E. - On the persistence of tumour initiation and the acceleration of tumour progression in mouse skin tumorigenesis. - Int. J. Cancer 1972, 9 (264-273).

( 95 ) Roe F.J.C., Peto R., Lee P.N. and Clack J. - A study of the influence of age on response to a carcinogen. - Exc. Med. Int. Congr. Ser. 1975, 3/351 (157-162).

( 96 ) Roels M.P. - Biochemical and cytophotometric study of the nuclear DNA-content in regenerating liver. - Enzymol. 1961, 23 (342-346).

( 97 ) Rohrbach R., Hecker E. and Sandritter W. - Cytophotometrische Messungen des DNS-Gehaltes der Epidermis nach unspezifischen, cocarcinogenen und carcinogenen Reizen. - Z. Krebsforsch. 1968, 70 (211-221).

( 98 ) Rohrbach R., Lau M., Thomas C., and Sandritter W. - Cytophotometric measurement of DNA and histone protein content in experiementally induced skin tumours of the rat and hairless mouse. - Beitr. Path. 1972, 146/2 (111-121).

( 99 ) Roth J.S. - Histones in development, growth and cancer. - Nature 1965, 207/4997 (599-601).

(100) Rubini J.R., Keller S. and Al. - Inhibition of tritiated thymidine incorporation into DNA by alkaline phosphatase préparations. - Cancer Res. 1964, 24 (655-661).

(101) Ryser H.J.P. - Chemical carcinogenesis. - New Engl. J. Med. 1971, 255/13 (721-734).

(102) Sabourdy M. - L'animal de laboratoire dans la recherche biologique et médicale. - Paris, Presses universitaires de France, 1967.

(103) Schmidt R. and Hecker E. - Autooxydation of phorbol ester under normal storage condition. - Cancer Res. 1975. 35/5 (1375-1377).

(104) Schmidt K.G., Schmähl D. and Misfeld J. - Investigation to determine a dose-response relationship and to estimate a threshold dose of the skin of two different mouse strains. - Zbl. Bakt. Hyg. I, Abt. B, 1973, 158 (62-68).

(105) Schröder R. - Zur statistischen Verteiling verschiedener Messgrössener in der Cyto- und der Histochemie. - Acta Histochem. 1968, 30 (297-305).

(106) Shamberger R.J. and Rudolph G. - Increase of lysosomal enzymes in skin cancers. - Nature (London) 1967, 213/5076 (617-618).

(107) Shugar D. - Quantitative staining in histo- and cytochemistry. - Progress in Biophys. and Biophys. Chemistry 1962, 12 (153-210).

(108) Sims P. - Metabolic activation of polycyclic hydrocarbons. - Exerpta Med. Int. Congr. Ser. 1975, 350/2 (9-14).

(109) Small E., Craig A. and Isenberg I. - Histone IV binding of 3,4-benzpyrene, pyrene, anthracene and 9-methylanthracene. -Biopolymers 1973, 12/5 (1148-1160).

(110) Spelberg T.C. - La fonction des histones. - Triangle (Sandoz) 1974, 13/4 (151-164).

(111) Spicer S.S. - Histochemically selective acidophilia of basic nucleoproteins in chromatin and nucleoli at alkaline pH. - J. Histochem. and cytochem. 1962, 10 (691-703).

(112) Spicer S.S. and Lillie R.D. - Histochemical identification of basic proteins with Biebrich scarlet at alkaline pH.- Stain Technology 1961, 36 (365-370).

(113) Spier H.W. and Martin K. - Histochemische Untersuchungen über die Phosphomonoesterasen der gesunden Haut mit Hinweis auf Befunde bei Hauterkrankungen. - Arch. Klin.Exp. Derm. 1956, 202 (120-152).

(114) Staats J. - Standardized nomenclature for inbred strains of mice. Third listing. - Cancer Res. 1964, 24/2 (147-168).

(115) Stutte H.J. - Hexazotiertes Triamino-Tritolyl Methanchlorid (Neufuchsin) als Kupplungssalz in der Fermenthistochemie. - Histochemie 1967, 8 (327-331).

(116) Szentirmay Z, Gyesko A. and Sugar J. - Quantitative cytochemical investigations on Ehrlich ascites tumour cells treated with vincristine. I. Feulgen cytophotometric investigations. - Z. Krebsforsch. 1972, 78 (82-89).

(117) Tarin D. - Sequential electron microscopical study of experimental mouse skin carcinogenesis. - Int. J. Cancer 1967, 2 (195-211).

(118) Tarin D. - Further electron microscopic studies on the mechanism of carcinogenesis: the specificity of the changes in carcinogen treated mouse skin. - Int. J. Cancer 1968, 3/6(734-742).

(119) Tsanev R. and Russev G. - Distribution of newly synthetized histones during DNA replication. - Eur. J. Biochem. 1974, 43 (257-263).

(120) Van Lente F., Jackson J.F. and Weintraub H. - Identification of specific crosslinked histones after treatment of chromatin with formaldehyde. - Cell. 1975, 5/1 (45-50).

(121) Vitalis B. - The effect of a long-term $CCl_4$ action on the DNA content of rat liver cell nuclei. A cytophotometric study. - Folia Histochem. et Cytochem. 1975, 13/3-4 (207-212).

(122) Wada B. - Mitotic cell studies based on "in vitro" observations. The instrinsic nature of cancer cells and of carcinogenesis as interpreted from viewpoint in reference to cell biology. - Cytologia 1974, 39 (165-178).

(123) Warnes T.W. - Progress report. Alkaline phosphatase. - Gut 1972, 13/11 (926-937).

(124) Watson J.D. - Biologie moléculaire du gène. - Ediscience Paris, 1968.

(125) Weisburger J.H. and Weisburger E.K. - Tests for chemical carcinogens. - Methods in Cancer Research, H. Busch, 1967, I (307-387).

(126) Winkelman J. and Spicer S.S. - The metachromatic interaction of Biebrich scarlet with histone and other cationic polymers.

(127) Wozniak L. and Wranicz A. - The changes of mast cells in precancerous and epithelial tumours in the skin. - Hautarzt 1968, 19/4 (158-163).

(128) Wynder E.L., Fritz L. and Furth N. - Effect of concentration of benzopyrene in skin carcinogenesis. - J. Natl. Cancer Inst. 1957, 19/3 (361-370).

(129) Wynder E.L. and Hoffmann D. - Tobacco smoking as a cause of cancer. - Cancer Progress, ed Raven R.W. 1960, (77-80).

(130) Wynder E.L. and Hoffmann D. - The epidermis and the respiratory tract as bioassay systems in tobacco carcinogenesis. - Brit. J. Cancer 1970, 24/3 (574-587).

(131) Yerly C. and Neukomm S. - Un test sensible et relativement rapide de cancérisation du poumon de la souris. - Zeitschr. für Präventivmed. 1973, 18 (385-390).